Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg
Geschäftsf. Vorstand: Prof. Dr. St. Thierfelder

DIE WIRKUNG VON ANTILYMPHOZYTENSERUM (ALS) AUF DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT THYMEKTOMIERTER UND NICHT THYMEKTOMIERTER PARABIONTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

1979

vorgelegt von

Rainer Schwerdtfeger
Würzburg/Ufr.

München 1977

Aus dem Institut für Hämatologie
der Gesellschaft für Strahlenforschung, Neuherberg
Geschäftsf. Vorstand: Prof. Dr. St. Thierfelder

DIE WIRKUNG VON ANTILYMPHOZYTENSERUM (ALS) AUF DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT THYMEKTOMIERTER UND NICHT THYMEKTOMIERTER PARABIONTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rainer Schwerdtfeger
Würzburg/Ufr.

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität München

Berichterstatter:. Prof.Dr.med. S. Thierfelder

Mitberichterstatter:.....

Dekan:..... Prof.Dr.med. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung:...5. Juli 1979.....

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung

I. Die Transplantation lymphohämopoietischen Gewebes, ihre Bedeutung und Problematik als Hintergrund für die vorliegenden Experimente. 4

II. ALS, Thymus, Thymektomie, Parabiose - eine kurze Einführung. 13

B. Material und Methoden

I. Verwendete Tierstämme 18

II. Vershciedene Vorbehandlungen (Thymektomie, ALS-Pools, ALS-Zubereitung, Toxizität und Wirksamkeit). 18

III. Hauttransplantate (Methode, Kontrolle) 20

IV. Parabiose 21

V. Chromosomenanalyse 23

VI. Zelltransplantation 23

C. Ergebnisse

I. Parabiose bzw. Zhymektomie und Parabiose und ihr Einfluß auf die zelluläre Immunität allogener Mäuse. 25

1. Parabiose
2. Thymektomie und Parabiose

II. Die zelluläre Immunität nicht thymektomierter und thymektomierter C57BL/6- und CBA-Mäuse nach Gabe von ALS 27

1. Wirkung von ALS allein
2. Wirkung von Thymektomie und ALS (9 Tage)

III. Die zelluläre Immunität thymektomierter bzw. nicht thymektomierter, 9 Tage mit ALS behandelter Parabionten 28

1. 9 Tage ALS und Parabiose
2. Thymektomie, 9 Tage ALS und Parabiose

IV. Die immunsuppressive Wirkung einer modifizierten ALS-Gabe auf nicht thymektomierte und thymektomierte CBL- und CBA-Mäuse (2 x 6 Tage) 31

V. Die Bedeutung der modifizierten ALS-Gabe bei Parabionten 31

1. 2x6 Tage ALS und Parabiose
2. Thymektomie, 2x6 Tage ALS und Parabiose

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546803_0044

Seite

VI. Das immunologische Verhalten "teilthymektomierter", syngener Parabionten gegenüber allogenen Hauttransplantaten. 34

1. Parabiose aus thymektomierter, 2 mal ALS behandelter CBL- und ALS behandelter CBL-Maus
2. Parabiose aus thymektomierter, ALS behandelter CBL- und unbehandelter CBL-Maus

VII. Die immunsuppressive Wirkung von ALS auf thymektomierte CBL-Mäuse vor Parabiose mit unbehandelten CBL x CBA- (F1) Mäusen. 35

VIII. Die Wirkung von ALS und Teilthymektomie im allogenen Parabiosesystem 36

1. CBA (ALS behandelt) in Parabiose mit thymektomierten, ALS behandelten CBL-Mäusen
2. CBL (ALS behandelt) in Parabiose mit thymektomierten, ALS behandelten CBA-Mäusen

IX. Chromosomenanalyse bei syngenen, thymektomierten, ALS behandelten und nicht thymektomierten, ALS behandelten CBA- bzw. CBA/T66-Mäusen nach Parabiose 38

1. Beide Partner vor ALS-Gabe und Parabiose thymektomiert
2. Ein Partner vor ALS-Gabe und Parabiose thymektomiert, der andere nicht thymektomiert

X. Die zelluläre Immunität thymektomierter (nicht thymektomierter), ALS behandelter CBL-Mäuse nach (i.v.) Transplantation unbehandelter CBL x CBA Milz und Lymphknotenzellen. 40

D. D i s k u s s i o n 42

E. Z u s a m m e n f a s s u n g 80

F. L i t e r a t u r n a c h w e i s 83

EINLEITUNG

In den letzten Jahren beschäftigte sich eine ständig wachsende Zahl von Biologen und Medizinern mit den Fragen und Problemen der Transplantation hämopoietischen Gewebes, der Transplantation von Knochenmark. Dieses Gebiet gewann umso mehr an Interesse und Bedeutung als es sich hi nicht einfach um das Verpflanzen eines in seiner Funktion klar verstandenen und kontrollierbaren Organs mit spezifischer Struktur von einem Organismus auf einen anderen handelt, sondern ganz allgemein gesprochen gleichzeitig um einen Eingriff in das Immunsystem, dessen Entstehung , Ausbildung und Fortwirkung auf das Allerengste mit dem hämopoietischen Gewebe verbunden ist (63,155,243); d.h. jede Manipulation mit und am blutbildenden Gewebe beeinflußt mehr oder weniger das Immunsystem,wobei unter dem Begriff Immun s y s t e m seine morphologische und funktionelle Einheit zu verstehen ist. Ein weiterer Unterschied zwischen klassischer Organtransplantation wie Niere, Haut etc. und der Transplantation von Knochenmark besteht darin, daß Letzteres gewöhnlich aus den langen, blutbildendes Mark enthaltenden Röhrenknochen oder im Falle der Transplantation beim Menschen aus dem Beckenkammknochen gewonnen, seine ursprüngliche "Gewebsstruktur" verliert und als Z e l l s u s p e n s i o n dem Empfänger i n f u n d i e r t wird, mit der Absicht das Empfängerknochenmark durch Spenderknochenmark zu ersetzen. Konnten Jacobson et al. (89) Mäuse trotz letaler Ganzkörperbestrahlung durch strahlensichere Abdeckung der Milz, die wie wir inzwischen wissen, bei Mäusen ein hämopoietisches Organ ist (22) am Leben erhalten und wenig später denselben protektiven Effekt durch die i.p. Injektion syngener Milzzellen in letal bestrahlte Mäuse erzielen, so bewahrten Lorenz et al (111) in ihren 1951 durchgeführten Experimenten bestrahlte Mäuse und Meerschweinchen erstmals durch die Transplantation syngener Knochenmarkzellen vor dem Strahlentod. Weitere Untersuchungen von Lorenz und Congdon (112,113) zeigten, daß auch die Injektion allogener Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Mäuse und Meerschweinchen zu einer im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen längeren Überlebenszeit führte. In der folgenden Zeit beschäftigten sich mehrere Forschungsgruppen mit der Ursache der therapeutischen Wirksamkeit hämopoietischer Zellen. Während die Gruppe um Jacobson entsprechend ihren Beobachtungen an bestrahlten Mäusen, deren Milz sie während der Bestrahlung geschützt hatten, an einen humoralen Faktor der Milz dachten, der die Regeneration des blutbildenden Gewebes stimulieren sollte (90,91) - diese Annahme beruhte auf histologischen Untersuchungen - neigten andere Wissenschaftler, unter ihnen vor allem Barnes und Loutit (11,12) mehr zur sog. zellulären Hypothese. Diese Hypothese machte sich folgende Erkenntnisse zu Nutze: Die

i.v. Gabe hämopoietischer Zellsuspensionen erwies sich der intraperitonealen Verabreichung als klar überlegen. Jedes zusätzliche Verfahren, das die Lebensfähigkeit der transplantierten Zellen minderte, hatte eine geringere therapeutische Wirksamkeit zur Folge und schließlich: Mäuse, die nach Bestrahlung syngene Milzzellen erhalten hatten, überlebten alle auf lange Zeit gesehen, während die Empfänger allogener Milzzellen nach mehreren Wochen starben. Lindsley et al. (110) bewiesen 1955 mit Hilfe serologischer Methoden, daß die Erythrozyten in letal bestrahlten Mäusen vom Knochenmarkspendertyp waren. Sie bestätigten damit die Richtigkeit der zellulären Hypothese und lieferten gleichzeitig nicht nur die Grundlage zu allen weiteren Untersuchungen, sondern erstmals auch die theoretische Voraussetzung für eine gezielte therapeutische Anwendung der Transplantation hämopoietischer Zellen. Mit dem Strahlenunfall von Vinča in Jugoslawien, bei dem mehrere Menschen inteniver Neutronen- u. Gammastrahlung von unbekannter Dosis ausgesetzt waren, fand die Knochenmarktransplantation ihren Eingang in die Geschichte der Medizin (1958). Wenngleich der unmittelbare therapeutische Effekt dieser Transplantationen umstritten, ja sogar unwahrscheinlich ist, d.h. die infundierten Knochenmarkzellen nur für einen begrenzten Zeitraum in dem Empfänger weiterlebten und nicht anwuchsen, war doch erstmals der Schritt von Tierexperimenten in den klinischen Anwendungsbereich getan.

Inzwischen wird die klinische Knochenmarktransplantation von einigen auf diesem Gebiet spezialisierten Medizinern an Patienten durchgeführt, die bestimmte Kriterien und Voraussetzungen erfüllen.

Wo liegen die therapeutischen Möglichkeiten der Knochenmarktransplantaion, welche Bedingungen müssen für ihre Anwendung gegeben sein, welche Probleme wirft sie auf?

Patienten mit irreversiblen Störungen der Blutbildung, der Erythropoiese bieten sich als Empfänger fremden hämopoietischen Gewebes an, sofern konventionelle Behandlungsmethoden nicht angeschlagen haben. Aplastische Anämien als verhältnismäßig häufig auftretende, der konventionellen Therapie meist unzugängliche Erkrankungen des Knochenmarks, sind Indikationen zur Transplantation. Storb et al. (207) berichteten z.B. über ihre Beobachtungen an 24 Patienten mit schwerer aplastischer Anämie, die Knochenmark von HL-A (Human-Histocompatibility Antigen) identischen Geschwistern erhalten hatten. 11 der Patienten lebten zur Zeit der Arbeitsveröffentlichung 141 bis 823 Tage post transplantationem. Neben den aplastischen Anämien fallen hämatologische Neoplasien in den Bereich der klinischen Knochenmarktransplantation. Auch hier bestätigen die bisherigen

Ergebnisse, daß die Übertragung hämopoietischer Zellen einen sinnvollen therapeutischen Weg darstellt (72,189). Besonders erfolgreich waren Transplantationen an 16 Patienten, durchgeführt seit 1970 von der Gruppe um Thomas in Seattle, die Knochenmark von identischen Zwillingen erhalten hatten. 8 dieser Patienten mit akuter, lymphatischer bzw. akuter, myeloischer Leukämie lebten nach der Transplantation unter vollständiger Remission nach meist mehrmonatiger erfolgloser Chemotherapie, während bei 5 Patienten die Leukämie wieder auftrat (61). Als wietere Indikationen für eine Knochenmarktransplantation sind Immundefizienzen zu nennen, die durch Übertragung fremder hämopoietischer Zellen zum Teil recht erfolgreich behandelt wurden (37,128), sodann Strahlenunfälle bei denen das hämopoietische System schwer geschädigt oder zerstört wurde und schließlich die Transplantation eines Organes, wie Niere oder Herz als Vorbehandlung zur Ausschaltung der Empfängerimmunreaktion gegen das fremde Transplantat.

Die therapeutische Wirksamkeit der Übertragung hämopoietischer Zellen beruht im Falle der Aplasie und des Strahlenunfalls auf einer Wiederbesiedlung des zerstörten Knochenmarks, im Falle hämatologischer Neoplasie auf dem Ersatz maligner durch normale Zellen und im Falle der Vorbereitung zur Organtransplantation im Ersatz der lymphopoietischen Zellen des Empfängers durch solche des Organspenders.

Welche Bedingungen müssen für das erfolgreiche Anwachsen transplantierter hämopoietischer Zellen gegeben sein ?

Sofern es sich nicht um eine autologe oder syngene Zellübertragung handelt, bei der Empfänger und Spender identisch (autolog) oder genetisch identisch (syngen) sind wie im Falle eineiiger Zwillinge, sondern um eine allogene oder xenogene Transplantation, muß die Immunreaktion des Empfängers gegen das Transplantat ausgeschaltet werden (allogene Transplantation: Übertragung zwischen Individuen unterschiedlichen genetischen Ursprungs aber innerhalb der gleichen Spezies, xenogene Transplantation: Übertragung zwischen Individuen unterschiedlicher Spezies). Die Zellen des Knochenmarks besitzen auf ihrer Zellmembran wie die übrigen kernhaltigen Zellen anderer Gewebe Gewebsantigene. Diese "Histocompatibilitätsantigene" sind für jedes Individuum charakteristisch und durch bestimmte Gen loci determiniert. Werden die Zellen einem "fremden" Individuum injiziert, rufen sie eine Sensibilisierung und spezifische Immunreaktion, d.h. eine Abstoßungsreaktion hervor.

Seit den ersten Anfängen der Knochenmarktransplantation dienen Ganzkörperbestrahlung und seit den Untersuchungen von Santos und Owens (187, 188) über die immunsuppresive Wirkung von Cyclophosphamid diese Zytostatikum auch beim Menschen als Immunosuppressivum zur Empfängervorbehand-

lung (190,206,217). Mathé (119), Rogentine et al. (178) konditionierten Knochenmarkempfänger mit ALS (siehe später) allein, konnten jedoch mit dieser Behandlung keinen langdauernden und kompletten Chimarismus (=Proliferation lebender lymphohämopoietischer Zellen eines genetisch verschiedenen Spenders im Körper eines Empfängers), sondern in den meisten Fällen nur einen gemischten Chimarismus erzielen, der nach Konditionierung mit Bestrahlung (geeignete Dosis) oder Cyclophosphamid gewährleistet ist. Die Immunsuppression durch Kombination von Bestrahlung und Endoxan (206,216, 218) oder mit ALS (72) scheint besonders sinnvoll bei Vorbehandlung von Knochenmarkempfängern, die an Leukämie erkrankt sind. Der zum Anwachsen der übertragenen Zellen benötigte"Raum", physikalisch und physiologisch (mikro-environment) verstanden (191) wird gleichzeitig durch die genannten Immunsuppressiva, Cyclophosphamid und Bestrahlung geschaffen. Die Knochenmarktransplantation erfolgt nach entsprechender Konditionierung als i.v. Infusion. Der wichtigste Faktor der heute über Erfolg und Prognose einer klinischen Knochenmarktransplantation entscheidet, ist die sog. Graft-versus-Host-Reaktion (GvH-R), die immunologische Reaktion der mit dem Knochenmark übertragenen immunkompetenten Zellen gegen den fremde Gewebsantigene tragenden Wirtsorganismus. Die für das Auftreten dieses Syndroms wesentlichen Voraussetzungen hat Billingham (32) in drei Punkten zusammengefaßt

1. das Transplantat muß immunologisch kompetente Zellen enthalten.
2. der Empfänger muß wichtige Transplantationsisoantigene aufweisen, die der Spender des Transplantates nicht besitzt, so daß der Empfänger als fremd erkannt wird und die Spenderzellen durch seine Antigenizität stimuliert.
3. der Empfänger selbst darf nicht zu einer wirkungsvollen immunologischen Reaktion gegen das Transplantat in der Lage sein, zumindest nicht für einen Zeitraum der dem Transplantat erlaubt, seine immunologische Reaktionsfähigkeit zu manifestieren.

Intensität und zeitliches Einsetzen der GvH-R - wir unterscheiden eine akute von einer chronischen - sind abhängig von der Zahl der transplantierten, immunkompetenten Zellen und vom Differenzgrad der genetisch bestimmten Histocompatibilitätsantigene zwischen Spender und Empfänger(24, 193).

Die von Billingham formulierten Bedingungen für das Zustandekommen einer GvH-R sind bei der allogenen Knochenmarktransplantation gegeben, da durch Konditionierung des Empfängers dessen Immunkompetenz ausgeschaltet wird und das Knochenmark immunkompetente, lymphoide Zellen enthält.

Gemeinsame Zeichen aller Formen der GvH-R sind: wasting, Wachstums - stillstand, Diarrhoe und eine erythematöse, desquamative Dermatitis (23).

Die GvH-R beim Menschen zeigt oft auch Hepatopathien aller Schweregrade, die klinisch durch Hepatomegalie, Anstieg der Serumtransaminasen, des Bilirubins und der alkalischen Phosphatase, histologisch durch Degeneration und eosinophile Nekrosen von Parenchym- u. Epithelzellen der kleinen Gallengänge imponieren (196,206). Eine zusätzliche Komplikation, möglicherweise Folge der GvH-R stellt die Immundefizienz der Chimären dar (71,156), als deren morphologisches Äquivalent eine schwere Lymphoidatrophie anzusehen ist, die sich meist 10 bis 32 Tage nach der Transplantation entwickelt und anhält, um dann nach ungefähr 200 Tagen (post transpl.) von einer langsamen Wiederbesiedlung des lymphatischen Gewebes mit kleinen Lymphozyten abgelöst zu werden (196). Untersuchungen an Hundelangzeitchimären ergaben, daß sowohl humorale als auch zelluläre Immunität während der ersten 200 Tage post transpl. stark eingeschränkt oder völlig fehlend, bis zur Normalität wiederkehren (156). Entsprechende Untersuchungen an erfolgreich transplantierten Patienten zeigen ähnliche Ergebnisse. Während jedoch Empänger syngenen Knochenmarks (eineiige Zwillige = Spender - Empfänger) ihre immunologische Reaktionsfähigkeit - wenn auch spät - wiedererlangen, zeigen die Empfänger allogenen Knochenmarks eine andauernde Immundefizienz (60). Der nicht oder unzureichend funktionierende Abwehrmechanismus eines Knochenmarkempfängers nach Transplantation macht ihn gegenüber einer Vielzahl von Viren, Bakterien und Pilzen schutzlos, so daß er auch nach dem Abklingen einer GvH-R einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt ist.

Schwerste lokale Infektionen, schergradige interstitielle Pneumonien sowie Sepsis verschiedener Genese als klinischer Ausdruck der Immundefizienz und die durch die transplantierten Zellen verursachte GvH-R sind heute die im Vordergrund stehende Probleme deren Lösung für eine erfolgreiche, als therapeutische Maßnahme selbstverständliche Transplantation hämopoietischer Zellen an erster Stelle stehen muß.

Wie läßt sich dem Problem der GvH-R begegnen? Es bieten sich mehrere Möglichkeiten von denen die Klinik teilweise bereits Gebrauch macht. Prinzipiell lassen sich die Methoden in zwei Kategorien einteilen:
A. Behandlung einer bereits eingetretenen oder einer sicher zu erwartenden GvH-R, d.h. Empfängerbehandlung nach erfolgter Knochenmarktransplantation. Prinzip und Ziel der GvH-R-Behandlung bestehen hier in der Suppression der mit den hämopoietischen Zellen übertragenen immunkompetenten Zellen im Empfängerorganismus, wobei gleichzeitig alle schädlichen Nebenwirkungen auf die hämopietischen Stammzellen vermieden werden müssen.

In Tierexperimenten konnten Owens und Santos (162) durch die Behandlung der Empfängertiere mit geringen Dosen Endoxan post transpl. eine Verlängerung der Überlebenszeit der Mäusechimären erzielen und die GvH-R abschwächen. Dies gelang ihnen nicht mit anderen Zytostatika wie Methotrexat, 6-Mercaptopurin, Mechlorethamin oder Cortison. Sie setzten mit ihrer Anti-GvH-R-Therapie ein, wenn sich das Syndrom bereits auszuprägen begann, während Storb et al. (202) in ihren Experimenten mit Hunden bereits am ersten Tag post transpl. Immunosuppressiva, wie Methotrexat oder Cyclophosphamid verabreichten. Die therapeutische Wirkung von Cyclophosphamid, die Owens und Santos beobachtet hatten, konnte Storb an Hunden nicht bestätigen. In ihrem System schien sich Methotrexat günstig für die Verhinderung einer GvH-R auszuwirken, wenn es unmittelbar nach Knochenmarktransplantation gegeben und - was wesentlich ist - für weitere 100 Tage beibehalten wurde (203, 204). Die Behandlung von Hybrid-Mäusen, denen parentale Milzzellen transplantiert worden waren unmittelbar oder sehr früh nach der Zellübertragung mit ALS führte nach Ledney und van Bekkum (104) ebenfalls zur Unterdrückung der akuten GvH-R. Einen deutlicheren Erfolg hatte eine entsprechende Therapie bei Affen nach allogener Knochenmarktransplantation (26). Die Ausbildung einer chronischen Sekundärkrankheit (GvH-disease) verhinderte die Empfängerbehandlung mit ALS jedoch nicht. Die erfolgreiche Beeinflussung einer bereits aufgetretenen GvH-R durch ALS oder ALS (-globulin) auch in Versuchen an Hundechimären (205) findet in dessen klinischer Anwendung zur GvH-Therapie ihren klinischen Ausdruck (206). Selbstverständlich unterscheiden sich die verschiedenen Immunosuppressiva nicht nur in ihrer Natur, Wirkungsweise und im Anwendungsschema, sondern auch in ihrer Toxizität und ihren Nebenwirkungen (26,162,202,203,206). Bei der Empfängerbehandlung mit Methotrexat oder Endoxan tritt ein klinisch erkennbares GvH-R-Syndrom in ungefähr 60%, eine schwere, lebensbedrohliche GvH-R in ca. 30% der allogenen Knochenmarktransplantationen auf (191). Insgesamt erscheint die GvH-R relativ resistent gegenüber Immunosuppressiva oder Zytostatika, so daß an andere therapeutische Wege gedacht werden muß, wobei der Verhinderung einer GvH-R von Anfang an eine größere Bedeutung zukommt als ihrer Unterdruckung. Ein wieterer Nachteil der unspezifischen Immunsuppression besteht in der Schwächung einer unter Umständen erwünschten immunologischen Aktivität der Spenderzellen gegen Empfängerleukämiezellen (118), die die Empfängerkonditionierung überlebten.

B. Versuch durch geeignete Maßnahmen und Behandlungsmethoden auf Seiten des Empfängers als auch Spenders vor Transplantation die Entwicklung einer GvH-R von vornherein auszuschalten oder abzuschwächen. Dazu gehören:

1. eine geeignete Empfänger-Spender-Auswahl; heute wird die Knochenmarktrans

plantation nur im HLA-kompatiblen Geschwister-Spender-Empfänger-System durchgeführt, d.h. zwischen zwei Individuen, die sich in ihren genetisch bestimmten und nach den Mendelschen Gesetzen vererbten Hauptgewebsantigenen nicht unterscheiden. Die HLA-Idendität von Spender und Empfänger wird durch spezifische Antiseren (serologische Typisierung) und mit Hilfe der MLC (Mixed Leukocyte Culture) in der sich Leukozyten HLA-identischer Geschwisterpaare nicht stimmulieren sollten, bestimmt (4). Die Gruppe in Seattle konnte in Experimenten mit Hunden klar zeigen, daß die Knochenmarktransplantation im DL-A (Haupthistocompatibilitätslocus des Hundes) i d e n t i s c h e n Empfänger-Spender-System eine signifikant längere Überlebenszeit des Empfängers zur Folge hatte (204,213) Einen entsprechend positiven Effekt hat die HL-A-identische Empfänger-Spender-Kombination nämlich eine weniger häufig auftretende und wenn doch eine sehr oft weniger schwer verlaufende GvH-R. Die geeignete Empfänger-Spender-Auswahl ist ein Versuch die 2. Voraussetzung für das Zustandekommen einer GvH-R nach Billingham (32) einzuschränken oder gar auszuschalten. Es existieren jedoch wahrscheinlich noch Nebengewebsantigene, die mit den Methoden der serologischen Typisierung und der MLC nicht erfaßt werden und für das Auftreten einer GvH-R auch im HLA-identischen Empfänger-Spender-System mitverantwortlich zu machen sind (196,198,201). Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß ein Empfänger durch Zellen eines histocompatiblen Spenders immunisiert werden kann, so daß er das spätere Transplantat abstößt (201).

2. Eine andere Methode - bisher allerdings noch auf den tierexperimentellen Bereich beschränkt -, die einer Transplantation hämopoietischer Zellen folgende GvH-R zu verhindern, besteht in der Empfänger v o r behandlung mit ALS (Erklärung siehe nachfolgendem Teil) vor Transplantation des Knochenmarks. Die ALS-Injektion 48 und 24 Stunden vor Transplantation zeigte bei Mäusen als auch bei Affen einen positiven Effekt hinsichtlich der Überlebenszeit der Chimären und verhinderte das Auftreten einer akuten GvH-R, jedoch nicht deren chronische Form (27,28). Die einer Empfängervorbehandlung mit ALS (~~natürlich~~ zusätzlich zur Konditionierung durch Cyclophosphamid oder Bestrahlung) zugrunde liegende Wirkung ist nicht vollkommen verstanden. Sie mag entweder darin bestehen, daß das ALS Empfängerlymphozyten "beseitigt", welche ihrerseits wahrscheinlich die (im GvH-R-Geschehen) mit dem Knochenmark transferierten Spenderlymphozyten zur Reaktion stimulieren (53), oder sie ist auf im Empfänger rezirkulierendes ALS zurückzuführen, welches vor allem auf reife, differenzeirte Spenderlymphozyten toxisch wirkt; daß ALS im peripheren Blut auch nach der Verabreichung einen längeren Zeitraum aktiv ist, zeigen die im Mäusesystem durchgeführten Untersuchungen Jeejeebhoys(94

Als weitere Erklärung bietet sich eine "Maskierung" der Empfängerantigene, speziell innerhalb des lymphatischen Gewebes an (125)

3. Der theoretische Hintergrund für eine S p e n d e r b e h a n d l u n g und für eine i n v i t r o Vorbehandlung des Knochenmark zur Vermeidung einer GvH-R beruht wiederum auf der Annahme, daß dieses Syndrom Ausdruck einer Immunreaktion der im transplantierten homopoietischen Gewebe existierenden reifen Lymphozyten oder deren Vorstufen gegen den fremden ~~und~~ Wirtsorganismus ist. Aus den Versuchen von Simonsen geht hervor, daß die GvH-R von ausdifferenzierten, immunkompetenten lymphozyten verursacht wird (193), von sog. thymuyabhängigen oder T-Zellen (7). Die selektive Entfernung dieser an der GvH-R beteiligten thymusabhängigen Lymphozyten aus dem Transplantat beeinflußt den therapeutischen Effekt einer Stammzellübertragung nicht. Dafür bieten sich zwei Wege an, von denen der erste experimentelle Bedeutung erlangt hat, der zweite über die experimentelle Bedeutung hinaus von klinischem Interesse ist.

a) Spendervorbehandlung: Ledney und van Bekkum (104,26) konnten bei Mäusen durch die Behandlung von Milzzellspendern mit ALS die akute GvH-R, die normalerweise zum raschen Tod des Empfängers unbehandelter Milzzellen führt, verhindern. Die Ergebnisse wurden durch Versuche von Boa und Wilson erhärtet (35). Noch erfolgreicher erwiesen sich, gemessen an zeitlichem Auftreten und Schweregrad der GvH-R, sowie an durchschnittlicher Überlebenszeit der Chimären die Vorbehandlung von Knochenmarkspendern (System:Maus) mit Antilymphozytenglobulin (105). Eine entsprechende Vorbehandlung mit ALS des Knochenmarkspenders in Versuchen an Affen brachte keinen Erfolg, d.h. weder zeiliches Auftreten noch Schwere der GvH-R noch Überlebenszeit der Empfänger wurden beeinflußt (26). Eine der ALS-Behandlung vorangegangene Spenderthymektomie konnte das Auftreten einer späten chronischen GvH-R nach allogener Knochenmarktransplantation bei Mäusen ebenfalls nicht völlig ausschließen (234).

b) Die Vorbehandlung von hämopoietischen Zellen in vitro - auch in der klinischen Knochenmarktransplantation ohne Risiken für Spender und Empfänger durchführbar - ist seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen. Frühere Versuche, die darin bestanden, Milzzellen (104) oder Knochenmark (26) mit ALS zu inkubieren, waren nicht sehr erfolgreich in Abschwächung oder Ausschaltung einer GvH-R. Die

Wirkung der verwendeten Antisera schien zu unspezifisch und richte-
te sich offensichtlich auch gegen hämopoietische Stammzellen, da di
Transplantate nach solcher Inkubation sehr häufig ihre therapeuti-
sche Wirksamkeit verloren und die Empfänger am Knochenmarksyndrom
(109,195,152) zugrunde gingen (25). Durch "Reinigung" herkömmliche
ALS' (220,145) oder Isolierung von Antikörperfragmenten (175,70) au
ALS lassen sich die unerwünschten Aktivitäten gegen Stammzellen ver
meiden. Die Inkubation von Milzzellen vor Transplantation mit der a
einem Anti-theta-Serum gewonnenen spezifisch lymphzelltoxischen Ig-
Fraction konnte in Langzeitversuchen eine GvH-R nahezu völlig ver-
hindern.

Nach diesen eher allgemein gehaltenen Bemerkungen über Knochen-
marktransplantation läßt sich zusammenfassend sagen, daß die techni
sche Seite der klinischen Knochenmarktransplantation heute kaum meh
ein Problem darstellt, während sehr viele Fragen über die eng mit
ihr verbundenen immunologischen Vorgänge zu beantworten sind. So
sind wir noch immer weit von einem klaren Verständnis der Pathogene-
se der GvH-R entfernt - ist sie allein durch Spenderzellen verur-
sacht, spielen Empfängerzellen ebenfalls eine aktive Rolle und wo-
durch wird sie aufrecht erhalten? Wodurch wird die bei Chimären be-
obachtete Immundefizienz verursacht? Wie ist sie morphologisch und
funktionell zu definieren? Und schließlich welche Mechanismen führe
zu einem dauerhaften, stabilen Chimarismus? Handelt es sich um spe-
zifische oder unspezifische Vorgänge? Spielen humorale Faktoren (Ma
gel oder Produktion) oder zelluläre Prozesse eine entscheidende Rol
le? Nur mit dem genauen Verständnis der Vorgänge, die sich hinter e
nem stabilen Chimarismus "verbergen", wird es möglich sein, gezielt
auf dessen Etablierung hinzuarbeiten und etwaige mit ihm verbundene
Mängel wie Immundefizienz zu korrigieren.

Die klinische Knochenmarktransplantation mit ihren Möglichkeiten
Problemen und Fragen,vor allem hinsichtlich Chimarismus und Toleran
bilden in weiterem und engerem Sinne den Hintergrund zu meinen Expe
rimenten. Die Verwendung hoch ingezüchteter Mäusestämme bietet durc
klar definierte Antigenverhältnisse eine willkommene Vereinfachung
für Versuchsplan, Analyse und Interpretation der Ergebnisse.

Eine kurze, generelle Beschreibung der in den Experimenten verwe
deten Mittel und Methoden soll das Verständnis der Versuche und ihr
Anordnung erleichtern:

A. A n t i l y m p h o z y t e n s e r u m

Heterologes ALS wird dadurch gewonnen, daß man Tieren einer Spezies Lymphozyten von Tieren einer anderen Spezies injiziert. Das Serum der injizierten Tieren enthält Antikörper gegen die ursprünglich injizierten Lymphozyten. Das Verfahren wurde erstmals von Metchnikoff 1899 beschrieben (127) und später modifiziert. Seither war und ist ALS und seine Wirkung im experimentellen wie klinischen Gebrauch Gegenstand intensiver Untersuchungen.

Die Wirkung von ALS - subcutan, intraperitoneal oder intravenös gegeben - besteht in einer Unterdrückung der zellulären und humoralen Immunantwort (141,230,239). Eine schon mit geringen Dosen ALS behandelte Maus trägt sowohl ein allogenes als auch xenogenes Hauttransplantat erheblich länger als eine unbehandelte Maus. ALS wirkt auch dann noch immunsuppressiv, wenn es nach Sensibilisierung durch fremde Gewebsantigene z.B. nach Hauttransplantation verabreicht wird und ist in geeigneten Dosen in der Lage die beschleunigte Abstoßung eines Zweittransplantates vom selben Gewebsantigentyp wie dem ersten zu verhindern (108,109,141). Die sekundäre, humorale Antikörperreaktion ist resistent gegenüber ALS (141). Die immunsuppressive Wirksamkeit von ALS wird entscheident durch den Zeitpunkt seiner Injektion in Relation zur Antigengabe bestimmt (sog. timing) (116,141). Die Überlebenszeit von Hauttransplantaten korreliert mit der Menge des verabreichten ALS (141); seine Aktivität liegt in der Immunglobulin G-Komponente (240), seine Wirkung ist temporärer Natur da in allen Fällen behandelte Transplantatempfänger die fremde Haut nach verlängerter Tolerierung abstoßen.(108,141,230,239). ALS ist nicht toxisch und wird auch bei Verabreichung über einen längeren Zeitraum verhältnismäßig gut vertragen (79,150).

B. T h y m u s - T h y m e k t o m i e

Die Funktion des Thymus war lange unbekannt und ist auch heute noch nicht vollständig verstanden. Experimente während der letzten Jahre, die sich vor allem auf eine eingehende Untersuchung thymektomierter Tiere (Mäuse, Ratten) stützten, führten zu der Erkenntnis, daß diese Organ eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Immunsystems spielt An Mäusen konnte gezeigt werden, daß die neonatale Thymektomie, d.h. die Entfernung des Thymusgewebes innerhalb 24 Stunden nach der Gebur

a) zu einer erhöhten Mortalität zwischen erstem und drittem Lebensmonat führte (133). Diese konnte auf eine erhöhte Infektionsbereitschaft zurückgeführt werden, denn die Sterblichkeit nahm signi-

fikant ab, wenn die Tiere unter pathogenfreien Bedingungen gehalten werden (138).

b) die Abstoßungsreaktion gegenüber gewebsunverträglichen Hauttransplantaten ganz erheblich verzögerte (= Beeinflussung der zellulären Immunität). Ein syngenes Thymustransplantat glich die Wirkung der neonatalen Thymektomie aus (129).

c) den Pool der kleinen rezirkulierenden Lymphozyten (in ductus thoracicus, peripherem Blut) deutlich reduzierte. D.h., daß die Entwicklung oder Entstehung der kleinen Lymphozyten von einem normal funktionierenden Thymus abhängt (133)

d) die Fähigkeit zur Antikörperbildung gegen bestimmte Antigene wie Schaferythrozyten herabgesetzt wurde (133)

e) nur die Entwicklung und R e i f u n g bestimmter Lymphozyten beeinflusste. Sobald die Zellen eine bestimmte Reifungsstufe erreichten, waren sie nicht mehr vom Thymus abhängig (133).

Parott (163) et al. untersuchten das lymphatische Gewebe neonatal thymektomierter Mäuse und zeigten, daß ganz spezifische Gebiete, die sog. thymusybhängigen Zonen von Lymphozyten entleert waren. 3 Wochen nach Thymektomie war diese Entleerung sichtbar. Die thymusabhängigen Areale sind in den Lymphfollikeln der Milz als periarterioläre und in den Lymphknoten als paracorticale Zonen zu erkennen. Die Autoren zeigten außerdem, daß markierte, syngene Thymuszellen nach Injektion in neonatal thymektomierte Mäuse vorwiegend in die thymusabhängigen Felder wanderten.

Die Thymektomie erwachsener Mäuse ist mit einer spät auftretenden geringgradigen Verminderung der Lymphzellpopulation mit zunächst keinem bemerkenswerten immunologischen Defekt verbunden (126). Nach letaler Ganzkörperbestrahlung und anschließender syngener Knochenmarktransplantation ist ein intakter Thymus zur Wiederherstellung der lymphopoitischen und immmunologischen Funktion des Zellempfängers - gemessen an Primär-und Sekundärantwort gegenüber dem Antigen Schaferythrozyten und an der Abstoßungsreaktion gegen allogene Hauttransplantate - notwendig (130). Mit anderen Worten: ohne den Thymus ist eine immunologische Reifung nicht möglich (41).

Die Untersuchungen über die Rolle des Thymus führten zu einer zunehmend klaren Trennung der Lymphzellpopulation in zwei, in ihrer Funktion unterschiedliche Zellarten. Wichtige Hinweise auf die Existenz der verschiedenen Lymphzellpopulationen lieferten Davies et al. (42) mit Experimenten, in denen sie zeigen konnten, daß

1. die sog. thymusabhängigen Zellen (nach Roitt,180) d.h. Lymphozyten, die irgenwann unter dem Einfluß des Thymus gestanden haben und in immunologisch "unreifen" Tieren z.B. neonatal thymektomierten nicht zu

finden sind, keine Antikörper bilden.

2. die sog. knochenmarkabhängigen (nach Roitt,180), d.h. sich aus Stammzellen des Knochenmarks differenzierenden, vom Einfluß des Thymus zu keiner Zeit abhängigen Lymphozyten in der Lage sind, Antikörper zu bilden.

3. zumindest einige Immunreaktionen in einer Interaktion zwischen thymusabhängigen, knochenmarkabhängigen Lymphozyten und Antigen bestehen.

Mitchell und Miller (137,135) bestätigten diese Ergebnisse und wiesen nach, daß der unmittelbare Vorläufer 19 S Antikörper bildender Zellen aus dem Knochenmark abstammt und zur Ausbildung seiner Funktionsfähigkeit des Thymus nicht bedarf. Sie leiteten aus ihren Resultaten ab, daß die Erkennung bestimmter Antigene eine Leistung der thymusabhängigen Lymphozyten ist, die durch Reaktion mit dem Antigen die knochenmarkabstammenden Lymphozyten zur Differenzierung in eine spezifische Antikörper bildende Zelle stimuliert. Überzeugend zeigten die Autoren (135,138 154),daß das Knochenmark die Vorläufer für Antikörper bildende Zellen enthält, dagegen kaum sog. antigenreaktive Zellen (T-Zellen), der Thymus einige genreaktive und der ductus thoracicus sehr viel mehr antigenreaktive als Antikörper bildende Zellen uns daß für die Antikörperbildung gegen Schaferythrozyten die Anwesenheit beider Zelltypen notwendig ist.

In der Folgezeit dienten zahlreiche Experimente einer weitergehenden Definition der Merkmale und Funktionen von B-(Knochenmark = bone marrow abhängig) und T-(=thymusabhängig) Zellen. Eines der wesentlichen Merkmale von T-Zellen besteht in einem spezifischen Zelloberflächenantigen, dem sog. Thetaantigen (168). B-Lymphozyten haben kein Thetaantigen. Weitere Unterscheidungsparameter sind Oberflächenimmunglobulindeterminanten, Oberflächenrezeptoren, periphere Lokalisation (Blut, ductus thoracicus, Lymphknoten, Milz, Sensitivität gegenüber Bestrahlung und Corticostroiden und Antigenreaktion)(100).

C. A L S und T h y m e k t o m i e

Die Bedeutung des Thymus für die Entwicklung der zellulären Immunkompetenz (129,133,130) und die Wirkung des ALS als Suppressivum besonders der zellulären Immunität (239,108,240,116,79) führten zur Frage, welchen Effekt Thymektomie und ALS-Behandlung auf die Immunität haben, bzw. ob und inwieweit die Wiedergewinnung kompletter Immunität nach Immunsuppression durch ALS thymusabhängig ist. Während erwachsene, nicht thymektomierte Mäuse für die Dauer einer Woche täglich mit ALS injiziert, ihre immunologische Kompetenz nach 4 Wochen wiedererlangen, führt eine der ALS-Behandlung vorangehende Thymektomie zu stark verlängerter Immunsuppression (140): Es sind im Einzelnen zu beobachten:

a)im Vergleich zu nicht thymektomierten Tieren eine doppelt so lang anhaltende Lymphopenie - peripher und im Lymphgewebe.

b) eine ausgeprägte Unterdrückung der primären und sekundären Immunreaktion gegenüber Schaferythrozyten.

c) eine signifikant verlängerte Überlebenszeit allogener Hauttransplantate, die sich im Hauptgewebsantigen unterscheiden. Der Abstoßungsprozeß verläuft langsam und protrahiert (140,144). Die subcutane Implantation eines isogenen Thymus gleicht eine der Serumbehandlung vorausgegangene Thymektomie weitgehend aus (140). Gemessen an der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate fand Jeejeebhoy (92) bei Ratten eine ausgeprägtere Immunsuppression, wenn sie vor ALS-Injektionen thymektomiert wurden. Thymektomie vor ALS-Behandlung verzögerte auch die Abstossungszeit allogener Tumortransplantate bei Hamstern deutlich (43).

D. P a r a b i o s e

Die Parabiose als Versuchsmodell wurde erstmals von Sauerbruch (192) an Kaninchen durchgeführt und beschrieben. Ihr wesentliches Merkmal besteht in einer durch operative Verbindung von Haut und Peritoneum zweier Individuen ermöglichte Kreuzzirkulation. Kreuzzirkulation nach Ausbildung von Gefäßanastomosen bedeutet, daß zwischen beiden Parabiosepartnern eine Vermischung sowie ein Austausch aller im Blut vorhandener Bestandteile stattfinden kann. Damit stellt die Parabiose weit mehr als eine einfache Organtransplantation dar. Angewandt im allogenen oder semiallogenen System gewann sie Parabiose als ein experimentelles Mittel zur gezeilten Beeinflussung der immunologischen Reaktionsfähigkeit im Sinne einer spezifischen Toleranzinduktion besonderes Interesse (siehe Diskussion).

Owen machte 1945 die wichtige Entdeckung, daß im Blut nicht identischer (heterozygoter) Zwillingskälber, deren Blutkreislauf durch eine gemeinsame Plazenta in Verbindung gestanden hatte,eine ansehnliche Zahl Erythrozyten vom jeweil anderen Zwilling zirkulierte (160). Rufen fremde Zellen normalerweise eine immunologische Abwehrreaktion hervor, die zu ihrer Abtötung führt,fehlte hier diese immunologische Reaktion gegenüber den Zellen des heterozygoten Zwillings. Burnet (38)zog u.a. aus dieser Beobachtung den Schluß, daß potentielle Antigene, mit denen die Lymphzellen während ihrer perinatalen Entwicklungsphase zur immunologischen Reife konfrontiert werden, auf irgend eine Weise jede künftige Reaktion gegen sie selbst spezifisch unterdrücken. Die immunologische

Unterscheidungsfähigkeit eines immunologisch "reifen" Tieres zwischen Selbst und Nichtselbst beruht nach Burnet darauf, welche Antigene in diesem Organismus zur Zeit seines immunologischen Reifungsprozesses existierten.

Medawar (30) konnte in CBA-Mäusen eine spezifische Toleranz gegenuber A-Gewebsantigenen erzeugen, wenn er foetalen CBA-Mäusen 3-4 Tage vor der Geburt A-Zellen injizierte.

In den vorliegenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Wirkung ALS auf die zellulare Immunität thymektomierter Parabionten hat und ob die Antigenpräsenz durch die Kreuzzirkulation (Parabiose) die Immunität immunsupprimierter, H-2-incompatibler Parabionten im Sinne der Entwicklung einer Transplantationstoleranz zu beeinflussen vermag.

MATERIAL und METHODEN

I. Verwendete Tiere

In allen Versuchen fanden ausschließlich 8–10 Wochen alte, ingezüchtete Mäuse vom Stamm C57BL/6J (H2b), CBA/J (H2k) bzw. CBAT66 und (CBA x CBL) F1 Verwendung. Lediglich als Hautspender dienten Mäuse vom AKR- (H2k) und Ajax-(H2a) Stamm. Die Versuchstiere wurden aus den Jackson Laboratories, Bar Harbour, Maine USA bezogen mit Ausnahme der F1-Hybriden, die unserer institutseigenen Zucht entnommen wurden. Die Mäuse erhielten Sniff-Mäusefutter und Trinkwasser mit Streptomycin in einer Konzentration von 1:25 000 ad.libitum. Der Gewinnung von heterologem Antimäuselymphozytenserum dienten Kaninchen.

II. Vorbehandlung

1. Thymektomie: 8 bis 10 Wochen alte Mäuse mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 -25g wurden nach der von Miller (Sudies on mouse leukemia,Brit. J.Cancer 14,93–98,1960) beschriebenen und in unserem Institut weiterentwickelten Methode thymektomiert. Die Operation erfolgte in Evipan-Na-Narkose: jedes Tier erhielt 2,5–3,3mg Evipan in 0,15 bis o,2ml Kochsalz i.p.. Dabei wurden die Mäuse in Rückenlage mit ihren Extremitäten vorsichtig auf einem kleinen horizontal verstellbaren Tisch fixiert. Die Überstreckung des Nackens führte zu einer extremen HWS-Loedose, die den ungehinderten Zugang zur Halsregion bzw. zum oberen Mediastinum ermöglichte. Nach Desinfektion dieser Region mit verdünnter Sagrotanlösung wurde in der Medianlinie ein Hautschnitt von der Halsmitte bis zum Manubrium sterni gelegt und anschließend die Haut entlang der Schnittlinie vom Unterhautgewebe und der Glandula submandibularis gelöst. Schon jetzt wurde eine Tabaksbeutelnaht mit Mersilenefaden angelegt, damit nach Thymusentfernung ein rascher Wundverschluß gewährleistet war. Die beiden Lappen der Unterkieferdrüse wurden dann nach cranial zurückgeklappt und so ein guter Zugang zu den Halsorganen und der oberen Mediastinalöffnung geschaffen. Zwei sich in der Höhe des 2. bis 3. Rippenansatzes treffende, keilförmig geführte parasternale Schrägschnitte dienten der Erweiterung der oberen Mediastinalöffnung und ermöglichten damit eine leichtere Entfernung der beiden Thymuslappen. Anschließend wurde die prätracheale Fascie, die sowohl die Trachea als auch die beiden Thymuslappen bedeckt mit einer Pinzette behutsam angehoben und entlang der Trachea bis ins obere Mediastinum hinein gespalten. Die jetzt mit ihrem cranialen Pol offengelegten Thymuslappen wurden - zuerst der linke dann der rechte - mit einem dünnen Glasröhrchen über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Um der Entstehung eines

Pneumothoray wirkungsvoll zu begegnen, mußte nun der Wundverschluß mit Hilfe der bereits liegenden Tabaksbeutelnaht möglichst rasch erfolgen.

Die Kontrolle über die Vollständigkeit der Thymektomie erfogte bei den meisten Versuchen histologisch, d.h. die Tiere wurden nach Versuchsende getötet, die Thoraxorgane mitsamt den Mediastinalorganen herauspräpariert, in Wachs gebettet und in Serienschnitten unter dem Mikroskop untersucht. Auch während eines Versuches gestorbene Tiere wurden auf diese Weise kontrolliert. Fanden sich in einem Präparat Thymusgewebsreste, so wurde das betreffende Versuchstier nicht gwertet. Bis zum Beginn mit der weiteren Behandlung (ALS,Parabiose) wurden jeweils 10 Tiere in einem Käfig gehalten.

2. ALS: a) In den Versuchsgruppen in denen ALS gegeben wurde,betrug die Einzeldosis jedes Mal o,25ml/Tag. Ausschließlich heterologes Kaninchen-anti-Mäuse-Lymphozytenserum (kurz ALS) fand Verwendung. Das Serum wurde nach einer von Gray et al. (79) angegebenen Methode hergestellt. Pool 61,63 und 71 wurden unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans, Pool 47 ohne dieses gewonnen.

b) 12 Wochen alten Kaninchen erhielten insgesamt 4 Injektionen von jeweils 100 x 10^6 Mäuse-Lymphknotenzellen von CBL-Tieren. Um eine möglichst hohe Zellzahl für die Immunisierung der Kaninchen zu erhalten, wurden CBL-Mäusen 1 Woche vor Entnahme der Lymphknoten jeweils 10^6 Lymphknotenzellen von syngenen Mäusen mit einer lymphatischen Leukämie injiziert. Drei Wochen nach der Immunisierung gegen Mäuselymphozyten (z.T. mit Freud'schem Adjuvans) erhielten die Kaninchen an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Boosterinjektion (ohne Freud'sches Adjuvans). Nach weiteren drei $T_a$gen wurden jedem Kaninchen 80ml Blut entnommen. 4 Tage später, also sieben Tage nach der letzten Boosterung wurden die Tiere entblutet. Das Blut konnte bei Raumtemperatur gerinnen und blieb bei 4^oC eine Nacht stehen. Das Serum wurde von den geronnenen Bestandteilen getrennt und zentrifugiert. Anschließend wurde Na-Merthiolat in einer Konzentration von 1:10 000 zugegeben. Eine Absorbtionskontrolle zum Nachweis von Mäuse-Erythrozyten-Hämagglutinin oder -Hämolysinen wurde nicht durchgeführt. Jeder ALS-Pool, der sich aus dem Serum mehrerer Kaninchen zusammensetzte, wurde bis zu seiner Verwendung bei -20^oC aufbewahrt.

c)Toxizität und Wirksamkeit des ALS: Vor seiner Verwendung wurde jeder ALS-Pool auf seine Lymphotoxizität (in vitro), auf seine Toxizität und seine Immunsuppression untersucht. Die Lymphotoxizität wurde mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion bestimmt. Da das ALS für seine Wirkung auf Lymphozyten Komplement benötigt, läßt sich an Hand eines ebenfalls komplementabhängigen Indikatorsystems (Hammelerythrozyten) der Komplementverbrauch feststellen. Unter Anwendung dieser Methode ergaben sich

für die in den beschriebenen Versuchen benutzten ALS-Pools folgende Titer:

Pool 47 Titer 1:1000
" 61 " 1:1000 (mit Freud'schem Adjuvans)
" 63 " 1:512 (" " ")
" 71 " 1:512 (" " ")

Zur Bestimmung der Toxizität eines Pools erhielten 7 CBL-Mäuse 6 Tage lang tgl. o,25 ml des entsprechenden Serums i.p.. Der Pool wurde als toxisch verworfen, wenn Tiere während dieser Behandlung oder an deren Folgen starben.

Um die immunsuppressive Wirkung eines ALS-Pools zu erfassen, wurden wiederum 7 Mäusen vom CBL-Stamm an 6 aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml Serum aus dem jeweiligen Pool s.c. injiziert. Am 7.Tage erhielten die so vorbehandelten Tiere ein allogenes (CBA) Hauttransplantat. Ein Pool galt als immunsuppressiv und wurde für weitere Versuche verwendet, wenn das allogene Transplantat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe deutlich länger toleriert wurde,die zelluläre Immunreaktion also herabgesetzt war. Für die verwendeten ALS-Pools fanden sich folgende Transplantatüberlebenszeiten:

Pool 47 (Titer 1:1000) : 18 bis 23 Tage
" 61 (" 1:1000) : 19 bis 25 "
" 63 (" 1: 512) : 19 bis 23 "
" 71 (" 1: 512) : 19 bis 23 "

III. H a u t t r a n s p l a n t a t e

Bei allen Versuchen wurde Haut im allogenen Spender-Empfänger-System, das sich in den starken Transplantationsantigenen (im H2-Locus) unterschied, transplantiert. Als Hauptspender dienten CBA/J, CBL/J,AKR und Ajax-Mäuse, als Empfänger CBA/J und CBL/J-Tiere. Einige Mäuse erhielten 2 verschiedene, allogene Hauttransplantate.

Ein Spendertier lieferte jeweils mehrere Hautstücke. In Narkose wurden die Rückenhaare mit einer Schere gekürzt, dann die Haut mit verdünnter Sagrotanlösung gereinigt und anschließend mit einer Stanze runde Hautlappen mit einem Durchmesser von 12 mm ausgeschnitten. Nach vorsichtigem Abpräparieren des subcutanen Gewebes wurde das Transplantat bis zu seiner weiteren Verwendung in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. In ähnlicher Weise wurde der Empfänger für das Transplantat vorbereitet. Nach Abscheren der Haare (am Rücken, links oder rechts paravertebral) und Säuberung der Haut wurde mit einer Schere vorsichtig ein dem Trans-

plantat an Größe entsprechendes Hautstück so herauspräpariert, daß das Unterhautgewebe möglichst unverletzt blieb. Nun wurde die Transplantatwunde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und angefeuchtet und das Transplantat aufgelegt; nach sorgfältiger Adaption der Wundränder erfolgte die Fixierung des Transplantates durch einen antibakteriellen Gazestreifen (Curatüll). Es folgten ein circulärer Verband aus Zellstoff, Leukovlies und Leukoplast als äußerste Lage. Die Verbände wurden, wenn nötig, ausgebessert und bei den Transplantatkontrollen am 14.,16.,28. und 21. Tag regelmäßig erneuert. Nach dem 21. Tag post transpl. wurden die Tiere nicht mehr verbunden.

Hauttransplantatkontrolle:

Die erste Kontrolle erfolgte bei allen Transplantatträgern regelmäßig am 14. Tag nach Transplantation. Weitere Kontrollen wurden am 16.,18. und 21. Tag durchgeführt. Ab der 3. Woche wurden die Transplantate weiterhin in wöchentlichen Abständen angesehen und beurteilt. Wenn nur noch 10% der ursprünglichen Transplantatgröße vorhanden waren, wurde die Haut im Versuchsprotokoll als abgestoßen gewertet. Als Zeichen einer beginnenden Abstoßung galten Schrumpfung des Transplantats, Entzündung, Krustenbildung und Haarausfall.

IV. P a r a b i o s e

Die Parabiosierung zweier Mäuse erfolgte nach einer von Sauerbruch und Heyde (192) erstmals an Kaninchen durchgeführten und in unserem Institut weiterentwickelten Methode. Durch die Parabiose wurde eine peritoneale Verbindung (Kommunikation zwischen beiden Leibeshöhlen) geschaffen. Als Parabiosepartner dienten syngene, semiallogene und allogene (H2-inkompatible) Mäuse gleichen Geschlechts. Nach Injektion von o,15 - o,2 ml (2,5 - 3,3 mg) Evipan-Na.-Lösung intraperitoneal wurden den Parabionten die Haare an der seitlichen Bauchwand in einem Bereich zwischen Hüftbein und unterer Thoraxapertur gekürzt (rechtsseitig bei dem einen, linksseitig bei dem anderen Partner), die Haut mit verdünnter Sagrotanlösung gereinigt und anschließend ein ca. 1,2 - 1,5 cm langer Hautschnitt parallel zur Körperachse gelegt. Entlang den Schnitträndern wurden Haut und Unterhautgewebe sorgfältig auseinanderpräparier Mit einem weiteren Schnitt konnten Unterhautgewebe und Muskulatur durchtrennt und das Peritoneum freigelegt werden. Um bei Eröffnung der Bauchhöhle den Darm vor Verletzungen zu schützen wurde nun das Peritoneum mit einer Pinzette schonend gefaßt, herausluxiert und mit einer sterilen Schere ein wenig eingeschnitten. Noch am Peritoneum haftende Darmschlingen konnte man mit einer Pinzette durch die gewonnene kleine Öffnung abstreifen. Dann wurde der ursprüngliche Peritonealschnitt auf ca.

1cm verlängert. War ein Tier soweit vorbereitet, wurde die Operationswunde mit einem sterilen, in physiologischer NaCl-Lösung getränkten Tupfer abgedeckt und der künftige Parabiosepartner in gleicher Weise behandelt. Nun erfolgte die Parabiosierung. Dabei wurden beide Partner Seite an Seite aneinandergelegt, wie bei einer Seit zu Seit-Anastomose am Darm, die sich entsprechenden Schnittränder des Peritoneums beider Tiere adaptiert und durch eine fortlaufende Catgut-Naht fest verbunden. Die Schnittränder des Peritoneums mußten sorgfältig adaptiert sein, um ein gutes Zusammenwachsen zu gewährleisten. In einer zweiten Schicht wurden daraufhin die ebenfalls gut angeglichenen Hautränder der beiden Partner miteinander vernäht. Diese Naht bestand aus Einzelnähten mit Mersilene-Fäden. Ein antibakterieller Gazestreifen (Curatüll) und eine darüberliegende dünne Verbandszellstoffschicht bedeckten die Wundnaht. Der Fixierung von Streifen und Zellstoff diente ein zirkulärer, die Körper beider Tiere umfassender Leukovliesstreifen und schließlich ein breiterer Streifen Leukoplast, der mehrfach um beide Tiere gewickelt wurde. Eine zusätzliche Stabilisierung erhielt die Parabiosebrücke durch einen langen,schmalen Leukoplaststreifen, der im rechten Winkel zum breiten Streifen mehrmals über diesen zwischen beide Tiere gewikkelt wurde. Da sich der Pflasterverband allein als unzureichend für Schutz und Zusammenhalt der Parabiosen erwies, mußte zusätzlich ein dünner, zirkulärer Gipsverband angelegt werden. Aus ihm wurde dorsal ein Fenster ausgeschnitten, da ohne diese Öffnung schwere Wundinfektionen, Vereiterungen und Schimmel an Verbandmaterial und Tieren infolge mangelnder Luftdurchlässigkeit aufzutreten drohten. Das etwas komplizierte Verfahren verhinderte, daß die sehr empfindlichen Parabiosepaare bereits während der 21 tägigen Parabiosezeit an den Folgen unzureichender Methodik zugrunde gingen. Im allgemeinen wurden drei, selten vier Paare in e i n e m Käfig gehalten. Besondere Pflegemaßnahmen waren im Vergleich zu anderen Versuchstieren nicht nötig. Außer Erneuerung bzw. Ausbesserung der Verbände wurden während der 3 wöchigen Parabiose keine Manipulationen an den Parabiosen vorgenommen.

Die Trennung der Paare erfolgte in allen Fällen am 22. Tag nach Parabiosierung. Nach Entfernen der Verbände wurden die Tiere mit Evipan narkotisiert, ihr Fell mit verdünnter Sagrotanlösung desinfiziert, die Hautbrücken sorgfältig inspiziert und anschließend durchschnitten. Auch die Peritonealverbindung zwischen beiden Tieren wurde genau auf Verwachsung und Ausbildung von Blutgefäßen von Partner zu Partner untersucht und dann ebenfalls durchtrennt. hier war besondere Vorsicht angezeigt, weil sehr häufig Darmschlingen des einen Partners in die

Bauchhöhle des anderen verlagert waren. Der Wundverschluß erfolgte durch je zwei getrennte Nähte: mit Catgut wurde in fortlaufender Naht die Peritonealhöhle verschlossen, mit Mersilenefaden in Einzelnähten die Hautwunde. Schutz und rasche Heilung der Op.-Wunde waren durch einen Verband ähnlich dem bei Hauttransplantaten gewährleistet. Diese Verbände verblieben nur noch eine Woche.

V. C h r o m o s o m e n a n a l y s e

Fur den Nachweis von Zellen eines Spendertieres in einem Empfängertier bietet sich durch Verwendung von CBA-T66-Mäusen die von Ford (62) beschriebene Methode an. CBA-T66-Mäusezellen unterscheiden sich von den Zellen "normaler" CBA-Tiere durch ein besonders kleines Chromosomenpaar, das bei mikroskopischer Betrachtung deutlich unter den 38 übrigen Chromosomen zu erkennen ist, bei den 4o Chromosomen einer CBA-Maus aber fehlt. In den Histokompatibilitätsantigenen besteht zwischen den Tieren beider Stämme kein Unterschied, sie sind syngen. Mit Hilfe dieser Analyse werden natürlich Zellen nur dann erfaßt, wenn sie sich in Teilung befinden und die Teilungsphase fixiert wurde.

Die zu untersuchenden Tiere erhielten 0,4 γ Colcemid /g Körpergewicht i.v. und wurden 3 Stunden später getötet. Anschließend wurden Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark (Sternum) herauspräpariert und aus jedem Organ eine Zellsuspension in isotoner NaCl-Lösung hergestellt. Nach Zugabe von Na.-Citrat-Lösung, Inkubation bei 37°C und Zentrifugieren erfolgte die Fixierung mit einer 1:4 Essigsäure-Methanol-Lösung. Die fixierten Zellen wurden auf einen Objektträger aufgeblasen, über einer Flamme vorsichtig getrocknet und schließlich mit Giemsalösung gefärbt. Getrennt nach Organen wurden die einzelnen Zellpräparate unter dem Mikroskop untersucht und quantitativ ausgewertet. Von jedem Organpräparat wurden 100 Mitosen ausgezählt, jede Mitose auf die Vollständigkeit ihres Chromosomensatzes kontrolliert und der prozentuale Anteil an CBA-T66- bzw. CBA-Zellen bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit diente die Analyse dem Nachweis von Partnerzellen im anderen Parabionten.

VI. Z e l l t r a n s p l a n t a t i o n

Die Spendermaus wurde mit Äther getötet, Milz und Lymphknoten (submandibuläre, axilläre, mesenteriale und inguinale) herauspräpariert und in einer mit 10 ml isotoner NaCl-Lösung gefüllten Petrischale vorsichtig zerkleinert. Nach Filtration durch sterile Gaze wurde die Zellsuspension bei 2000 Umdrehungen/min 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen erneut in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Jeder Zellempfänger erhielt 3 Injektionen von je 0,2- 0,3 ml dieser Lösung mit 100×10^6 Zellen in eine der Schwanzvenen. Um der Ge-

fahr von Embolien vorzubeugen, wurden allen Empfängermäusen vor Zelltransplantation 50 Einheiten Heparin i.p. gespritzt.

ERGEBNISSE

Thymektomie, ALS und Parabiose beeinflussen in isolierter oder kombinierter Anwendung insbesondere bei Mäusen die zelluläre Immunität. Da die Abstoßung von Organ - bzw. Hauttransplantaten eine Leistung bestimmter Lymphozyten des zellulären Immunapparates ist, lassen sich natürliche oder durch Manipulation bedingte Veränderungen des Systems verhältnismäßig einfach mit Hilfe von Hauttransplantaten erfassen. Die Überlebenszeit allogener (H2-incompatibler) Hauttransplantate gilt deshalb als meß- u. vergelichbarer Parameter für die Beurteilung der Wirksamkeit einer Empfängerbehandlung. In allen Versuchen wurde Mäusen nach unterschiedlicher Vorbehandlung ein allogenes Hautstück transplantiert und die Transplantatüberlebenszeit registiert und ausgewertet.

In einem Kontrollversuch galt es zunächst die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei völlig unbehandelten Empfängertieren zu ermitteln. Da für die weiteren Untersuchungen ausschließlich Mäuse vom C57BL 6 und CBA-Stamm als Empfänger und Hautspender dienten, interessierte das Verhalten dieser Tiere gegenüber der fremden Haut. Von den 10 CBA-Mäusen, die ein CBL-Hautstück erhalten hatten, stießen 8 die Haut innerhalb der ersten 14 Tage, zwei zwischen dem 14. und 21. Tag ab. Alle 10 CBL-Mäuse zeigten am 14. Tag nach Transplantation eine totale Abstossung der CBA-Haut (Abb. 5) In einem weiteren Kontrollversuch wurde die Wirkung der Parabiose auf die zelluläre Immunität syngener (thymektomierter) Parabionten untersucht. Zweimal je fünf CBL- und je fünf CBA-Mäuse wurden thymektomiert bzw. blieben nicht thymektomiert und wurden 6 Wochen später parabiosiert. Alle Parabiosen überlebten die Parabiosephase. Eine Woche nach Trennung erhielten die Partner ein allogenes CBA- bzw. CBL-Hauttransplantat. Sämtliche CBA-Parabionten, thymektomiert onder nicht thymektomiert stießen die CBL-Haut innerhalb der ersten 16 Tage ab, alle CBL-Parabionten die CBA-Haut innerhalb von 14 Tagen. Das Ergebnis zeigt, daß

1. die Parabiosierung und syngene Parabiose von den Versuchstieren gut überstanden wird (alle Paare überlebten)

2. weder Parabiose noch Thymektomie und Parabiose an sich einen Einfluß auf die zelluläre Immunität der Partner haben.

Um nun das Zsammenspiel von ALS, Thymektomie und Parabiose hinsichtlich seiner Wirkung auf die zelluläre Immunität erfassen zu können, war es nötig, zunächst zu untersuchen welche Rolle den einzelnen Faktoren zukommt.

I. Die Wirkung der Parabiose bzw. von Thymektomie und Parabiose auf die zelluläre Immunität allogener Mäuse

1.Parabiose: 10 CBL-Mäuse (14 Wo. alt) wurden mit 10 gleichaltrigen CBA-Mäusen parabiosiert. 21 Tage später (am 22. Tag) erfogte die Trennung (Abb.1). Von den 10 Parabiosepaaren erlebte nur eines den Trennungstag, die übrigen 9 starben zwischen dem 12. und 21. Parabiosetag (Abb.2). Es fiel auf, daß in der Mehrzahl der Fälle die CBA-Maus starb. Das CBA-Partnertier wurde daraufhin getötet. Eine eingehende makroskopische Untersuchung der gestorbenen Parabiosen und des einen überlebenden Paares zeigte bei erheblich abgemagerten Tieren in keinem Fall Verwachsungen von Haut und Peritoneum im Bereich der Parabiosebrücken. Deutliche Gefäßzeichnungen bzw. Anastomosen im Peritoneum über die Nahtstelle hinweg fehlten; ohne Mühe ließen sich die Partenr nach Durchschneiden der Fäden trennen. Jeder der beiden überlebenden Parabionten erhielt 7 Tage nach Trennung ein Hauttransplantat vom Gewebsantigentyp des Partners und gleichzeitig ein weiteres H2-incompatibles Fremdtransplantat: Das CBL-Tier CBA- und AKR-Haut, das CBA-Tier CBL- und Ajax-Haut. Bei der Transplantatkontrolle konnte eine beschleunigte Abstoßung der Partnertransplantate bereits am 5. (CBL) und 6. (CBA) Tag festgestellt werden. Die Überlebenszeit der beiden anderen Hautstücke betrug bei der CBL-Maus 10 , bei der CBA-Maus 16 Tage.

Die Ergebnisse lassen sich in folgenden Punkten zusammenfassen:

a) Die Parabiosierung allogener, H2-inkompatibler CBL- und CBA-Mäuse bringt eine hohe Letalität der Partner mit sich. Ein makroskopisch sichtbarer Gefäßshunt bildet sich nicht aus.

b) Die Parabiose führt zu einer gegenseitigen Sensibilisierung der Partner, erkennbar an der beschleunigten Abstoßung (second-set-Reaktion) der allogenen Partnertransplantate (beschleunugt, im Vergleich zur Abstoßung allogener Haut bei unvorbehandelten Tieren gleichen Stammes).

c) Die Reaktion gegenüber fremden Zweittransplantaten bleibt durch die vorausgegangene Parabiose unbeeinflußt.

Einschränkend ist zu sagen,daß die Punkte b und c die Beobachtung an nur einem Parabiosepaar betreffen.

2. Thymektomie und Parabiose: (Abb.4) Jeweils 10 CBL- und CBA-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen thymektomiert und 6 Wochen später als Parabiosepartner verwendet. Die weitere Behandlung entsprach der der ersten Gruppe. Nach 21 Tagebn Parabiose lebten noch 6 Paare (Abb.2). Jeder Pa-

rabiont erhielt am 8. Tag nach Trennung (10 Wo. nach Thymektomie) ein Partnertransplantat. Die Inspektion des Peritonealshunts bei Trennung der lebenden und toten Parabiosen ließ keinen Unterschied zu den Verhältnissen bei (unbehandelten) nicht thymektomierten Parabiosen erkennen. Auch die Transplantatüberlebenszeiten der Partnerhaut entsprachen denen der ersten Gruppe. Die 6 CBA-Mäuse stießen ihre CBL-Haut beschleunigten zwischen dem 6. und 10. Tag, die 6 CBL-Mäuse ihre CBA-Transplantate zwischen dem 5. und 7. Tag ab. Die Ergebnisse dieses Versuches erlauben folgende Beurteilung:

a) Eine der Parabiose vorausgehende Thymektomie beider Partner beeinflußt das immunologische Verhalten der Parabionten unwesentlich (s. Hauttransplantate)

b) Im Vergleich zu nicht thymektomierten Parabionten überlebten jedoch mehr thymektomierte Parabionten die Parabiosephase von 21 Tagen (6:1, Abb.2).

II. Die zelluläre Imunität nicht thymektomierter und thymektomierter Mäuse nach Gabe eines heterologen ALS.

1. Die Wirkung von ALS: Je 10 CBL- und CBA-Mäuse erhielten im Alter von 10 Wochen an 9 aufeinanderfolgenden Tagen täglich o,25 ml ALS (Pool 63) subcutan. Am Tage nach der letzten Serumgabe wurde den CBL-Tieren ein CBA-Hautstück, den CBA-Tieren ein CBL-Hautstück transplantiert, die Transplantate beobachtet und die Zeit bis zur Abstoßung registriert. Bis zum 56. Tag hatten alle CBA-Mäuse die Transplantate abgestoßen, bis zum 28. Tag alle CBL-Tiere ihre Transplantate (Abb.5 und 7). Nach 9-tägiger Behandlung mit ALS war demnach die Transplantatüberlebenszeit bei Mäusen beider Stämme im Vergleich zu unbehandelten Tieren deutlich verlängert.

2. Die Wirkung von Thymektomie und ALS: Nach Monaco et al. (140) wird die immunsuppressive Wirkung von ALS durch eine vorangehende Thymektomie erheblich verstärkt. Hier sollte speziell die Wirkung von Thymektomie und neuntägiger ALS-Behandlung auf das immunologische Verhalten von Mäusen der Stämme CBA und CBL untersucht werden. Wiedrum je 10 CBL- und CBA-Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen thymektomiert und erhielten 14 Tage später - wie im vorausgegangenen Versuch - an 9 aufeinanderfolgenden Tagen je o,25 ml Serum s.c.. Am Tage nach der letzten Serumgabe

wurde jedem Tier ein allogenes CBA- bzw. CBL-Hautstück transplantiert (Abb.6) CBL-Mäuse stießen das CBA-Transplantat zwischen dem 35. und 56 Tag ab. Mäuse vom CBA-Stamm trugen die CBL-Haut bis zu 150 Tage und länger (Abb.5 u. 7). Ein zweites Hauttransplantat, das von Ajax-Mäusen stammte und am 100. Tag nach dem Ersttransplantat gesetzt wurde, tolerierten die 8 CBA-Mäuse ebenso wie die CBL-Haut.

Eine der ALS-Therapie vorausgehende Thymektomie verstärkte demnach die immunsuppressive Wirkung der 9-tägigen Serumgabe bei CBL- und CBA-Mäusen erheblich - kenntlich an der deutlich verlängerten Überlebenszeit allogener Hauttransplantate. Die verlängerte Transplantatüberlebenszeit war besonders ausgeprägt bei Mäusen vom CBA-Stamm, von denen 50% eine Abstoßungsreaktion erst nach dem 150. Tag zeigten; sie war nicht so auffallend bei Mäusen vom CBL-Stamm, die nach Thymektomie und 9 Tage ALS die Transplantate ungefähr doppelt so lang trugen wie nicht thymektomierte ALS-behandelte Tiere. Aus dem gleichen Verhalten der CBA-Tiere gegenüber Zweittransplantaten geht hervor, daß hier eine allgemeine unspezifische Schwächung des zellulären Immunsystems vorliegt.

Bis zum Zeitpunkt der Absoßung, die in allen Fällen langsam erfolgte, zeigten die Transplantate einen üppigen Haarwuchs.

Die Parabiose zwischen allogenen, H2-incompatiblen Mäusen führte zu einer gegenseitigen Sensibilisierung und zu einer hohen Sterberate der Partnertiere; wurden die Tiere vor Parabiosierung thymektomiert, sank die Sterblichkeit. Eine Änderung der Transplantatüberlebenszeiten im Vergleich zu nicht thymektomierten Parabionten trat jedoch nicht ein. Die 9-tägige Empfängerbehandlung mit ALS verlängerte die Überlebenszeit allogener Hauttransplantate, Thymektomie verstärkte den Effekt.

III. Einfluß von ALS bzw. Thymektomie und ALS auf die Parabiose und das imunologische Verhalten der Parabionten

1. ALS und Parabiose, Beurteilung der zellulären Immunität an Hand von Prtnertransplantaten: Die ALS-Behandlung erfolgt in der üblichen Weise. 10 Wochen alten CBA- und CBL-Mäusen wurden 9 mal 0,25 ml ALS s.c. injiziert, die Parabiosierung am Tage nach der letzten Serumgabe durchgeführt. Die Parabiosedauer betrug 21 Tage. Am 8.Tag nach Trennung (entspricht 4 Wochen nach der letzten Serumgabe) der Paare erhielt jeder Parabiont ein Hauttransplantat vom Partner. Die Transplantate wurden sorgfältig beobachtet und die Überlebenszeiten registriert (Abb.7). 80% der Paare (8/10 Parabiosen) konnten am 22. Parabiosetag getrennt werden, 2 Paare starben während der Parabiosezeit (Abb. 2 u. 3). Die eingehende Inspektion der Parabiosebrücke bei Trennung der Paare ließ in allen Fällen erkennen, daß Haut, Muskulatur und Peritoneum beider Partner fest

miteinander verwachsen waren. Im Peritoneum waren deutliche Gefäßinjektionen, die zum großen Teil als Anastomosen von einem Parabionten zum anderen verliefen, erkennbar. Bei keinem Tier fanden sich während und nach Parabiose Anzeichen einer Parabiosekrankheit (s.Diskussion).

5 CBA-Parabionten stießen ihr CBL-Transplantat zwischen dem 22. und 28. Tag, einer bereits zwischen dem 14. und 21. Tag und 2 zwischen dem 29. und 35. Tag ab.Bei den 8 CBL-Mäusen, die CBA-Hautstücke erhalten hatten, wurden folgende Transplantatüberlebenszeiten festgestellt: 1 Tier trug die Haut bis zum 14. Tag, 6 Tiere bis zum 21. und ein weiteres Tier bis zum 28. Tag (Abb.7 u. 9). Die Ergebnisse zeigen, daß die 9-tägige ALS-Behandlung beider Parabionten vor Parabiose

a) die Ausbildung eines funktionsfähigen Shunts ermöglichte (Verwachsung von Haut und Peritoneum unter Bildung einer gemeinsamen Bauchhöhle sowie zahlreicher Gefäßbrücken),

b) eine Sensibilisierung durch partnerliche Gewebsantigene und

c) das Auftreten einer Parabiosekrankheit verhinderte.

d) die Parabiosesterblichkeit deutlich reduzierte.

Will man die Hauttransplantatüberlebenszeiten nach ALS- und Parabiose-Behandlung des Empfängers mit den Überlebenszeiten allogener Haut nach alleiniger ALS-Therapie vergleichen, muß berücksichtigt werden, daß im Parabiosefall die Transplantate 28 Tage nach der letzten Serumgabe gesetzt wurden - dazwischen lagen Parabiose und eine behandlungsfreie Woche nach Trennung - , daß dagenen im Falle der 9-tägigen ALS-Behandlung des Empfängers das fremdeHautstück am Tage nach der letzten Serumgabe transplantiert wurde (das entspricht im Parabioseversuch dem Tag der Parabiosierung). Bezogen auf den Tag der letzten ALS-Gabe fanden sich für die ALS-behandelten Parabionten längere Hauttransplantatüberlebenszeiten als für die nur mit ALS therapierten Empfänger. Dies galt besonders für die Tiere vom CBL-Stamm. Rechnet man als Transplantatüberleben zeit streng die Zeit zwischen Transplantation (ohne Berücksichtigung der Parabiose) und Abstoßung, erhält man für die Hautuberlebenszeiten bei Parabionten geringere Werte als bei nur mit ALS behandelten CBL- und CBA-Mäusen (Abb.7).

2. Thymektomie, ALS und Parabiose: Um die Wirkung der Thymektomie auf die zelluläre Immunität mit ALS und Parabiose behandelter Tiere zu untersuchen, wurden je 10 Mäuse vom CBL- und CBA-Stamm (im Alter von 8 Wo.) thymektomiert und 14 Tage später einer 9-tägigen ALS-Therapie (tgl 0,25 ml Serum s.c.) unterzogen. Es folgten - wie in vorangegangenen Parabioseversuchen - eine 21 Tage dauernde Parabiose, Trennung und 1 Woche später die Transplantation allogener Prtnerhaut (Abb. 10). Von den

10 Paaren konnten am 22. Parabiosetag 8 getrennt werden (Abb.2 und 3). Wie bei der nicht thymektomierten und mit ALS behandelten Parabiosegruppe zeigten sich auch hier ausgezeichnete Shuntverhältnisse. Haut und Peritoneum der Parabionten waren lückenlos verwachsen und deutlich sichtbare Gefäßanastomosen von Partnertier zu Partnertier ausgebildet. 1 Woche nach Trennung erhielten die 8 CBL- und CBA-Parabionten jeweils ein Partnerhauttransplantat. Nach anfänglich üppigem Haarwuchs wurden alle Transplantate bis zum 56. Tag langsam abgestoßen. Die Abstoßung erfolgt im einzelnen bei 6 CBL-Mäusen mit CBA-Haut zwischen dem 22. und 28. und bei 2 zwischen 29. und 35. Tag, bei einer CBA-Maus mit CBL-Haut zwischen dem 29. und 35., bei 3 zwischen dem 36. und 42., bei 2 zwischen dem 43 und 49. und wiederum 2 zwischen dem 50. und 56. Tag nach Transplantation (Abb. 7 und 9). Betrachtet man die Ergebnisse im Zusammenhang mit den bisherigen Versuchen, so läßt sich folgendes sagen:

a) Die Thymektomie beider Partnertiere vor einer 9 Tage währenden ALS-Behandlung und 21 Tage dauernden Parabiose führte im Vergleich zur Hauttransplantatüberlebenszeit nach ALS-Gabe und Parabiose allein zu verlängerten Transplantatüberlebenszeiten allogener Partnerhaut.

b) Ermöglichten bei CBA-Mäusen die Thamektomie und 9-tägige ALS-Behandlung Überlebenszeiten von CBL-Hauttransplantaten in der Größenordnung von 80,100 und mehr Tagen, so bewirkte die zusätzliche Parabiose mit dem in gleicher Weise vorbehandelten Hautspender eine raschere Wiedererlangung der immunologischen Reaktionsfähigkeit gegenüber dem Gewebsantigen. Eine länger anhaltende spezifische oder unspezifische Toleranz der Empfängertiere gegenüber den Transplantationsantigenen des Parabiosepartners konnte weder nach immunsuppressiver Therapie mit ALS (9 Tage tgl. 0,25 ml) und anschließender massiver und spezifischer "Ahtigenkonfrontation" in Form der 21 Tage dauernden Parabiose noch nach Thymektomie beider Partner (Empfänger),ALS-Therapie und Parabiose beobachtet werden.

Im folgenden Parabioseversuch (Versuch V) wurde deshalb untersucht ob der zelluläre Immunapparat einer CBL- oder CBA-Maus durch eine modifizierte ALS-Therapie spezifisch oder unspezifisch zu beeinflussen ist.

Untersuchungen in unserem Institut hatten ergeben, daß CBL-Mäuse, die in einen 14-tägigen Abstand je 2 mal 6 Tage (tgl. 0,25 ml s.c.) ALS erhalten hatten, CBA-Hauttransplantate signifikant länger trugen als Mäuse, die nur einmal an 6 oder 7 aufeinanderfolgenden Tagen mit ALS behandelt worden waren. Der folgende Versuch sollte zunächst die Wirkung einer doppelten ALS-Gabe auf das zelluläre Immunsystem thymektomierter CBA- und CBL-Mäuse prüfen.

IV. Die Immunsuppressive Wirkung einer doppelten ALS-Therapie

Je 10 Mäuse vom CBL- und CBA-Stamm wurden im Alter von 8 Wochen thymektomiert. 14 Tage später erhielten alle Tiere an 6 aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml ALS subcutan (Pool 61). Nach einer behandlungsfreien Zeit von 14 Tagen wurde nochmals 6 Tage lang 0,25 ml ALS s.c. gegeben. Die Gesamtdosis betrug demnach 3,0 ml Serum. Am Tage nach der letzten Serumiejektion wurde den CBA-Mäusen ein CBAL-Hautstück, den CBL-Mäusen ein CBA-Hautstück transplantiert und die Transplantatübe lebenszeit beobachtet. 2 CBA-Mäuse stießen die Haut zwischen dem 100. und 150. Tag nach Transplantation ab, 8 trugen die Transplantate länger als 150 Tage Auch von den CBL-Mäusen zeigten 2 erst zwischen dem 100. und 150. Tag Abstoßungsreaktionen. während die übrigen 8 ihre Transplantate zwischen dem 36. und 100. Tag abstießen (Abb.5).

Am 100.Tag nach dem Ersttransplantat erhielten alle Mäuse mit noch intakter Spenderhaut ein zweites Transplantat und zwar CBA-Mäuse Ajax-Haut und CBL-Mäuse AKR-Haut. Die Reaktion der Empfängertiere auf Zweittransplantate entsprach der auf Ersttransplantate d.h. gleichzeitig mit der Abstoßung der ersten Haut erfolgte auch die Abstoßung des Zweittransplantates. Wurde das Ersttransplantat toleriert, erfolgte auch keine Abstoßung des Zweittransplantates (nur bei CBA).

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß bei thymektomierten CBA- und CBL-Mäusen durch die wiederholte ALS-Gabe an jeweils 6 Tagen in 14-tägigem Abstand eine deutliche Verlängerung der zellulären Immunsuppression erzielt werden konnte. Ganz besonders imponierend die stark verzögerten Abstoßungsreaktionen, wenn man die Gruppe der thymektomierten, zwei mal mit ALS-behandelten CBL-Mäuse mit den CBL-Tieren vergleicht, die nach Thymektomie nur einer einmaligen, 9 Tage dauernden ALS-Therapie (Gesamtdosis 2,25 ml) unterzogen worden waren (Abb.5). Die "doppelte" ALS-Gabe führte sowohl bei CBL- als auch bei CBA-Mäusen zu einer intensiven, unspezifischen Immunsuppression.

Im folgenden Versuch wurde nun untersucht welche Veränderungen die modifizierte ALS-Behandlung im immunologischen Verhalten thymektomierte und nicht thymektomierter Parabionten hervorruft.

V. Die Wirkung einer doppelten ALS-Therapie auf die zelluläre Immunität thymektomierter und nicht thymektomierter Parabionten

Die Anordnung für den Versuch entsprach - bis auf die ALS-Behandlung - der vorangegangener Parabiosevversuche. 2 Wochen nach Thymektomie erhielten 10 CBL- und CBA-Mäuse an 6 aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml ALS

(Pool 63) s.c.. Nach einem behandlungsfreien Intervall wurde die ALS-Therapie in der gleichen Weise wiederholt. Die Parabiosierung erfolgte wie in früheren Versuchen am Tage nach der letzten Serumgabe. 21 Tage später wurden die Parabiosen getrennt, eine Woche nach Trennung erhielten die Partner ein Hauttransplantat. Allen Tieren, die am 100.Tag nach der ersten Hauttransplantation noch intakte Spenderhaut trugen, wurde ein zweites, ebenfalls stark unverträgliches, partnerfremdes Hautstück transplantiert (CBA-Mäuse erhielten Ajax-Haut, CBL-Mäuse AKR-Haut). Eine 2. Gruppe nicht thymektomierter CBL- und CBA-Mäuse wurde nach dem gleichen Schema behandelt (Abb. 11). Während die Parabioseüberlebensrate der nicht thymektomierten Parabiosen 100% betrug, d.h. alle 10 Paare am 22 Tag getrennt werden konnten, lag die Überlebensquote in der thymektomierten Versuchsgruppe bei 70% (Abb.2). Da in dieser Gruppe jeweils eine CBL- und eine CBA-Maus nach der Trennung starben, erhielten insgesamt 6 Tiere jeden Stammes Partnertransplantate. 3 CBL-Mäuse stießen ihre CBA-Haut zwischen dem 22. und 42. Tag, 1 am 140. Tag ab. 2 zeigten nach dem 150. Tag völlig gesunde CBA-Transplantate und ließen auch keine Abstoßungsreaktion gegenüber den Zweittransplantaten (AKR-Haut) erkennen. Bei einer CBL-Maus erfolgte mit der Abstoßung der CBA-Haut am 140. Tag auch die Abstoßung der AKR-Haut (Abb.8 u. 12). Von den 6 thymektomierten CBA-Parabionten trugen 5 sowohl ihr CBL- als auch ihr Ajax-Hauttransplantat über den 150. bzw. 50. Tag hinaus; 1 Tier stieß die CBL-Partnerhaut zwischen dem 71. und 77. Tag ab (Abb.5, 8 u. 12).

In der nicht thymektomierten Gruppe betrugen die Überlebenszeiten von CBA-Hauttransplantaten bei CBL-Mäusen bis zu 49 Tage, von CBL-Hauttransplantaten bei CBA-Mäusen bis 56 Tage (Abb.5 u. 8).

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß

a) der prozentuale Anteil an thymektomierten und nicht thymektomierten Paaren, die nach einer modifizierten ALS-Therapie (2 mal je 6 Tage tgl. 0,25 ml s.c. im Gegensatz zu 1 mal 9 Tage tgl. 0,25 ml) die Parabiosezeit von 21 Tagen überlebten unverändert gegenüber dem Anteil überlebender Parabiosepaare aus den Versuchsgruppen ist, bei denen vor Parabiosierung eine einmalige ALS-Therapie durchgeführt worden war (Abb. 2).

b) die Hauttransplantatüberlebenszeiten bei nicht thymektomierten, 2 mal mit ALS behandelten Parabionten nur gering verlängert waren im Vergleich zu den Transplantatüberlebenszeiten bei Parabionten, die nur ein mal 9 Tage lang ALS erhalten hatten.

c) im Gegensatz dazu die Abstoßungsreaktion gegen die stark unverträglichen Partnertransplantate bei thymektomierten Parabionten - so-

wohl vom CBA- als auch vom CBL-Stamm - nach Vorbehandlung mit ALS in einer Dosierung von 2 mal 6 Tagen sehr spät, bei einigen Tieren, vor allem bei CBA-Mäusen gar nicht eintrat (Abb.5). Diese trugen noch am 200.Tag (Ende der Beobachtungszeit) völlig intakte Hauttransplantate (CBL- und Ajax-Haut).

d) durch die Thymektomie,wiederholte ALS-Behandlung und 3-wöchige Parabiose in mehreren Fällen (80% CBA und 30% CBL) die zelluläre Abwehrreaktion der Parabionten gegen Hauttransplantate vom Gewebsantigentyp des Parabiosepartners unbegrenzt unterdrückt werden konnte.

Da eine sichtbare Reaktion nicht nur gegen die Partnerhaut sondern auch gegen partnerfremde Hauttransplantate ausblieb, handelte es sich bei der veränderten Reaktionslage der Empfänger um eine schwere allgemeine Immunsuppression (s. Diskussion).

Die bisherigen Ergebnisse lassen sich nochmals kurz zusammenfassen:

a) Die immunsuppressive Behandlung mit ALS und die anschließende Parabiose führten n i c h t zu einer sich über einen längeren Zeitraum erstreckenden Toleranz der allogenen CBL- und CBA-Parabionten gegenüber den stark unverträglichen Gewebsantigenen des Partners.

b) Nach Thymektomie b e i d e r Partner, Immunsuppression mit ALS und folgender Parabiose konnten bei den Parabionten zwar erheblich verlängerte, zum Teil sogar unbegrenzte Partnerhauttransplantatüberlebenszeiten beobachtet werden, die erzielte Reaktionslosigkeit war jedoch in allen Fällen unspezifisch und erstreckte sich auch auf Gewebsantigene, die dem Parabiosesystem fremd waren.

Die Überlegungen zu den weiteren Untersuchungen gingen von diesen Befunden aus.Da in einem nicht thymektomierten Parabiosesystem keine dauerhafte, in einem thymusfreien Parabiosesystem zwar eine dauerhafte aber nur unspezifische Toleranz erzeugt werden konnte, stellte sich die Frage ob das System einen Thymus "braucht", um bei einem der Parabionten einen Zustand s p e z i f i s c h e r Toleranz herbeizuführen. Es sollte mit anderen Worten festgestellt werden, ob der Thymus für die Gewinnung spezifischer Toleranz mit Hilfe der Immunsuppression durch ALS und der massiven,spezifischen "Antigenkonfrontation" in Form der Parabiose eine Bedeutung hat.

Unter Beibehaltung der bisherigen Behandlungsmodi -und-Schemata beschäftigen sich deshalb die folgenden Versuche mit der Rolle des Thymus bei "teilthymektomierten", syngenen, semiallogenen und schließlich allogenen Parabiosen.

VI. Die Wirkung von ALS auf die zelluläre Immunität teilthymektomierter Parabiosen

1. Nach ALS-Behandlung beider Partner: 10 thymektomierter CBL-Mäuse wurden mit 10 nicht thymektomierten Mäusen vom selben Stamm parabiosiert. Alle Parabionten hatten vorher 2 mal je 6 Tage ALS (tgl. 0,25 m s.c., Pool 71) im Abstand von 14 Tagen erhalten. Die Trennung erfolgte nach 21 Tagen. Da 8 Paare überlebten, konnte je 8 Parabionten eine Woche nach Trennung CBA-Haut transplantiert werden. Von den nicht thymektomierten Tieren stießen eines das Transplantat zwischen dem 15. und 2 Tag, 4 zwischen dem 22. und 28. Tag und 3 zwischen dem 29. und 35. Tag ab. Für 3 thymektomierte CBL-Mäuse lag die Transplantatüberlebenszeit bei 22 bis 28 Tagen, für 4 bei 29 bis 35 Tagen und für ein Tier zwisch 36 und 42 Tagen (Abb. 13 u. 14)

2. Nach ALS-Behandlung des thymektomierten Partners: 10 thamektomierte und in derselben Weise (2 mal 6 Tage) mit ALS behandelte CBL-Mäuse wurden mit gleichaltrigen, u n b e h a n d e l t e n CBL-Tieren parabiosiert. 90% der Parabiosen überlebten und wurden am 22. Tag getrennt. Die Parabionten erhielten 1 Woche später CBA-Hauttransplantate. Biszum 28. Tag nach Transplantation hatten alle Tiere dieser Gruppe, vorbehandelt und unbehandelt, die CBA-Haut abgestoßen (Abb. 13 u. 14)

Bei beiden Versuchsgruppen fällt auf, daß die jeweils zusammengehörenden, thymektomierten und nicht thymektomierten CBL-Parabiosepartner die CBA-Hauttransplantate innerhalb des gleichen Zeitraumes abstießen. Das bedeutet, daß die Wirkung der Thymektomie eines Parabionten auf dessen zelluläre Immunität im einen Fall, und die von Thymektomie und ALS-Behandlung wiederum nur des einen Parabionten im anderen Fall durch den nicht thymektomierten Partner abgeschwächt bzw. neutralisiert wurde. Aus der Zusammenstellung der CBA-Hauttransplantatüberlebenszeiten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL-Mäusen in Abb. 15 geht hervor, daß im teilthymektomierten, syngenen Parabiosesystem der thymektomierte Parabiont dem Einfluß des nicht thymektomierten Partners untersteht. Ein Vergleich der in Abb. 13 aufgeführten Überlebenszeiten von CBA-Hauttransplantaten bei den syngenen Parabionten des letzten Versuches (1 CBL-Partner thymektomiert und mit ALS behandelt, der andere CBL-Parabiont unbehandelt) mit der Überlebenszeit von CBA-Haut bei völlig unbehandelten CBL-Mäusen läßt eine deutliche Differenz erkennen. Betrug sie im letzt genannten Fall höchstens bis zu 14 Tage, erfolgte sie Abstoßung der Transplantate bei syngenen Parabionten in einem Zeitraum bis zu 28 Tagen.

Wurde in Versuch VI nachgewiesen, daß in teilthymektomierten, syngenen Parabiosesystem der Thymus des nicht thymektomierten Partners die zelluläre Immunität b e i d e r Parabionten nach Immunsuppression mit ALS beeinflußt, so beschäftigt sich der folgende Versuch mit der Frage, ob und mit welchen Folgen für die zelluläre Immunität des thymektomierten Partners ein Thymuseinfluß auch über die "Schranken" der Histoincompatibilität hinweg besteht.

Mäuse vom CBL (=Parental-) und CBL x CBA (=Filial-) Stamm dienten als Parabionten. Die Verwendung von Parental- und F1-Tieren hat den wichtigen Vorteil, daß nur der eine Parabiont nämlich das Parentaltier einer immunsuppressiven Behandlung bedarf, damit sich während der Parabiose ein wirksamer Shunt ausbilden kann und keine Unverträglichkeitsreaktionen auftreten. Das F1-Tier ist auf Grund seiner genetischen Bestimmung tolerant gegenüber den elterlichen Gewebsantigenen, also nicht in der Lage gegen parentales Gewebe oder Zellen zu reagieren.

VII. D i e W i r k u n g v o n A L S a u f d i e z e l l u l ä r e I m m u n i t ä t t e i l t h y m e k t o m i e r t e r, s e m i a l l o g e n e r P a r a b i o s e n

20 Mäuse vom CBL-Stamm erhielten - entsprechend den vorangegangenen Versuchen - 14 Tage nach Thymektomie an 6 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,25 ml ALS (Pool 71) s.c.. Die Serumgabe wurde nach 2 Wochen in gleicher Weise wiederholt. Am Tag nach der letzten Injektion erfolgte die Parabiosierung mit gleichaltrigen, unbehandelten CBLxCBA-Mäusen, 3 Wochen später die Trennung. Nach Ablauf einer weiteren Woche wurde den CBL-Mäusen ein CBA-Hautstück transplantiert und 100 Tage nach dem Ersttransplantat ein zweites, allogenes (AKR) Hauttransplantat gesetzt. 90% der Parabiosen überlebten, 1 CBL-Tier starb 3 Tage nach Parabiosetrennung, so daß 17 CBL-Mäuse ein Transplantat erhalten konnten. Während 2 Tiere die Haut zwischen dem 36. und 42. Tag, 2 weitere zwischen dem 50. und 56. Tag und ein Tier zwischen dem 100. und 150. Tag abstießen, zeigten 12 CBL-Parabionten auch am 200. Tag keine Abstoßungsreaktionen und trugen völlig intakte CBA-Haut (Abb. 16 u. 18). Alle 13 Tiere stießen das AKR-Hautstück, das ihnen am 100. Tag nach dem Ersttransplantat transplantiert worden war innerhalb von 16 Tagen ab (Abb. 12).

Die Ergebnisse zeigen Folgendes:

a) Während thymektomierte und mit ALS behandelte CBL-Mäuse durch die Parabiose mit unbehandelten und mit ALS behandelten, nicht thymektomierten (syngenen) CBL-Partnern ihre uneingeschränkte zelluläre Immunkompetenz innerhalb kurzer Zeit wiedererlangten (s. Transplantatüberlebenszeiten von CBA-Haut, Abb. 13), führte die Parabiose thymektomierter,

mit ALS behandelter (Parentaltiere) CBL-Mäuse mit unbehandelten, also auch thymustragenden, semiallogenen (F1) CBLxCBA-Tieren zu einer Veränderung der Immunität der Parentalmäuse (Abb. 16 und 18)

b) Die Empfängertiere ließen eine völlig normale zelluläre Immunreaktion gegen die AKR-Haut erkennen; sie waren jedoch tolerant gegenüber den Transplantationsantigenen des nicht thymektomierten, semiallogenen CBLxCBA-Partners (CBA-Komponente),wie aus den unbegrenzten Überlebenszeiten der CBA-Hauttransplantate hervorgeht. Am unterschiedliche Verhalten gegenüber AKR- und CBA-Transplantaten wird ersichtlich, daß die Toleranz spezifisch war.

Dem semiallogenen Parabiosesystem stand - analog dem syngenen Parabiosesystem - durch den in seiner immunologischen Kompetenz unbeeinträchtigten F1-Parabionten einerseits ein Thymusorgan, andererseits ei spezifische Antigen-und Zell- "Quelle" zur Verfügung.

Nach diesen Befunden wurde im folgenden Versuch mit besonderem Inte esse die Frage untersucht, ob es mit Hilfe der teilthymektomierten Parabiose in Verbindung mit ALS-Behandlung möglich sein sollte, im Gegen satz zum thymusfreien (beide Partner sind thymektomiert) und nicht thy ektomierten (beide Partner nicht thymektomiert) Parabiosesystem eine spezifische Toleranz auch bei homozygot allogenen Parabionten, die sic im H2-Locus unterscheiden zu induzieren.

VIII. Die Wirkung von ALS auf die zelluläre Immunität teilthymektomierter allogener Parabiosen

1. Thymektomie der CBL-Partner: Nach Vorbehandlung mit ALS, das in 14 tägigem Abstand 2 mal je 6 Tage verabreicht worden war (tgl. 0,25 ml s.c.,Pool 71) wurden 10 CBA-Mäuse mit 10 thymektomierten, in entsprechender Weise mit ALS behandelten CBL-Mäusen am Tage nach der letzten Serumgabe parabiosiert.

2. Thymektomie der CBA-Partner: Im Unterschied zur ersten Versuchsgruppe wurden in der zweiten Gruppe die CBA-Tiere vor ALS-Behandlung und Parabiose thymektomiert, während die CBL-Partner ihren Thymus behielten.

Die Trennung erfolgte wieder, wie in allen bisherigen Versuchen am 22. Tag nach Instandsetzung der Parabiosen. In beiden Gruppen lag die Parabioseüberlebensrate bei 80%, das heißt je 8 CBL- und 8 CBA- Parabionten aus jeder Gruppe erhielten am 8. Tag nach Trennung ein Hauttransplantat vom Gewebsantigentyp des Partners (als Hautspender dienten durchweg Versuchstiere, die vorher keiner Manipulation unterzogen worden waren). Trugen die Empfängertiere am 100. Tag noch ein intak-

tes Hautstück, wurde ihnen ein zweites, ebenfalls stark unverträgliches Transplantat gesetzt (AKR-Haut auf CBL, Ajax auf CBA; Versuchsanordnung s. Abb. 17).

In der ersten Gruppe, in der die CBL-Parabionten thymektomiert, die CBA-Partner nicht thymektomiert waren, stießen 4 CBL-Mäuse ihr CBA-Transplantat zwischen dem 36. und 69. Tag, 1 zwischen dem 100. und 150. Tag ab. 3 CBL-Tiere (ungefähr 37%) zeigten auch am 200. Tag (Ende der Beobachtungszeit) noch völlig einwandfreie CBA-Hauttransplantate. Die AKR-Haut, die 100 Tage nach der ersten Transplantation übertragen worden war, wurde innerhalb von 21 Tagen abgestoßen (Abb. 12, 16 und 18). Bei allen nicht thymektomierten CBA-Parabionten erfolgte sie Abstoßung innerhalb der ersten 42 Tage (s. Abb. 16).

In der zweiten Gruppe, in der sie CBA-Parabionten thymektomiert, die CBL-Partner nicht thymektomiert waren, fand sich eine ähnliche(auf die Empfängervorbehandlung bezogen) Situation. Von den 8 (thymektomierten) CBA-Parabionten stießen 2 ihr CBL-Transplantat zwischen dem 22. und 35. Tag ab. 1 Tier starb 21 Tage nach Trennung mit den deutlich ausgeprägten Zeichen einer chron-ischen Sekundärkrankheit. 5 CBA-Tiere (ca. 62%) tolerierten die Partnerhaut auch noch am 200. Tag und zeigten ohne Ausnahme einen kräftigen Haarwuchs der schwarzen CBL-Hautstücke. Die Abstoßung der Ajax-Zweittransplantate erfolgte bei 4 Tieren (50%) innerhalb von 28 Tagen, blieb jedoch bei einem Tier ganz aus (Abb.12). Die nicht thymektomierten CBL-Parabionten hatten alle bis zum 35. Tag die CBA-Partnerhaut abgestoßen (Abb. 16 und 18).

Vergleicht man das immunologische Verhalten der nicht thymektomierten Parabionten beider Gruppen mit dem der thymektomierten Parabionten, so fällt auf, daß - im Gegensatz zu letzterem - die thymustragenden Partner einheitlich ihre immunologische Kompetenz auch nach Immunsuppression durch ALS und nach "Parabioseeinfluß" verhältnismäßig rasch innerhalb von 2 bis 6 Wochen nach Parabiosetrennung wiedererlangten. Dies wird an Hand der Immunreaktion gegen die Partnerhauttransplantate deutlich. Die thymektomierten, ALS behandelten Parabionten zeigten dagegen ein völlig anderes, unterschiedliches Verhalten: während ein Teil dieser Tiere die Fähigkeit zur zellulären Immunreaktion - allerdings zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt - wiedergewann, konnte bei den übrigen Parabionten überhaupt keine Abstoßungsreaktion beobachtet werden. Diese Tiere waren tolerant gegenüber den Partnertransplantaten und hatten gleichzeitig ihre immunologische Reaktionsfähigkeit gegenüber partnerfremden Transplantationsantigenen wiedergewonnen, wie die Abstoßung

der Zweittransplantate bewies.

Führte die Parabiose, wenn sie sich einer massiven Immunsuppression durch Thymektomie und durch wiederholte, je 6 Tage währende ALS-Behandlung beider Parabionten anschloß bei 33% (2/6) CBL- und 83% (5/6) CBA-Partnern zur Entwicklung einer anhaltenden, unspezifischen Toleranz(s. Expr. V), gelang es hier bei einigen thymektomierten Tieren beider Stämme (50% CBA und 37% CBL) nach entsprechender ALS-Behandlung und Parabiose mit nicht thymektomierten, ALS behandleten, allogenen Parabionten eine s p e z i f i s c h e Toleranz zu erzielen (Vergl. s. Abb. 18). Die Spezifität bezog sich auf die Transplantationsantigene, mit denen der thymektomierte Parabiont während der Parabiose konfontriert war.

Aus allen bisherigen Untersuchungen geht hervor, daß eine spezifische Toleranz im Zusammenhang mit Thymektomie, ALS-Therapie und Parabiose nur dann auftrat, wenn das Parabiosesystem nicht "thymusfrei" war, sondern unter dem Einfluß des Thymus eines Parabionten stand. In diesem teil-thymektomierten Parabiosesystem fand sich die spezifische Toleranz ausschließlich bei den thymektomierten Partnern.

Die auffallenden Unterschiede im immunologischen Verahlten zwischen CBL- und CBA-Mäusen - der Anteil an spezifisch oder unspezifisch toleranten CBL-Mäusen war in allen Versuchen trotz sich entsprechender Vorbehandlung im Vergleich zum Anteil an spezifisch oder unspezifisch toleranten CBA-Mäusen geringer - rühren offensichtlich von CBL-spezifischen, immungenetischen Faktoren her, die in anderem Zusammenhang bei verschiedenen Autoren Erwähnung finden (2,19,67,81).

Aufschluß darüber, ob bei der Toleranzentstehung in teilthymektomierten Parabiosen Zellverteilungsphänomene eine Rolle spielen, sollte die Chromosomenanalyse bei entsprechend vorbehandelten, syngenen Parabionten geben. Die Untersuchungen wurden an 2 Parabiosegruppen durchgeführt.

IX. E i n f l u ß v o n A L S a u f d i e Z e l l t r a n s p l a n t a t i o n i n t e i l t h y m e k t o m i e r t e n, s y n g e n e n P a r a b i o s e n

Beide Gruppen bestanden aus je 10 syngenen Paaren, als Parabiosetiere dienten CBA- und CBA/T66- Mäuse. In der einen Gruppe (Kontrolle) wurden beide Partner (CBA und CBA/T66) vor Parabiosierung thymektomiert und erhielten nach bekanntem Schema 2 mal 6 Tage lang ALS. Die Parabiose erfolgte einen Tag nach der letzten Serumgabe. In der 2. Gruppe wurde nur ein Parabiont, die CBA-Maus thymektomiert, der andere Parabiont (CBA/T66) blieb nicht thymektomiert. Die Serumbehandlung war in

beiden Gruppen gleich (2 aml je 6 Tage ALS). Jeweils 3 Paare jeder Gruppe wurden am 1., 10. und 21. Tag nach Parabiosierung getötet. Thymus (soweit vorhanden), Milz, Lymphknoten und Knochenmark wurden jedem Parabionten entnommen, in der beschriebenen Weise zu Zellsuspensionen verarbeitet und unter dem Mikroskop auf ihren Gehalt an Partner-(=Spender) Zellen untersucht.

Ein Blick auf die Tabelle mit den Ergebnissen - von jedem Organpräparat wurden 100 Mitosen ausgezählt, der Chromosomensatz auf seine Vollständigkeit (40) geprüft und der prozentuale Anteil an Fremdmitosen bestimmt - läßt erkennen, daß

a) innerhalb beider Gruppen das Knochenmark sehr wenig, Milz und Lymphknoten einen sehr geringen Prozentsatz Partnerzellen enthielten.

b) nach 10 bzw. 21 Tagen Parabiose in beiden Gruppen die Zahl der transplantierten Zellen in den verschiedenen Organen gering zunahm.

c) ein geringer Unterschied in der Zellverteilung zwischen der thymusfreien und der teilthymektomierten Parabiosegruppe bestand.

Während sich bei der thymektomierten Parabiosegruppe der prozentuale Anteil an Partnerzellen in beiden Parabionten in etwa entspricht, enthielten die thymektomierten CBA-Tiere vor allem am 21. Tag etwas mehr Zellen vom nicht thymektomierten CBA/T66-Partner als umgekehrt. Bezogen auf die Situation bei teilthymektomierten, allogenen Parabiosen weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, daß

a) die spezifische Toleranz gegenüber stark unverträglichen Gewebsantigenen, die mit der hier beschriebenen Behandlungsmethode bei einigen Parabionten induziert werden konnte mit einem geringgradigen Chimarismus verbunden sein könnte, vorausgesetzt, das zelluläre Verhalten sich in der Vorbehandlung entsprechender syngener und allogener Parabionten ist gleich.

b) im theilthymektomierten Parabiosesystem der verbleibende Thymus des einen Parabionten offensichtlich nur einen sehr geringen Einfluß auf die Zellverteilung bzw. "Strömungsrichtung" und Proliferation der immunkompetenten Zellen der b e i d e n Partnertiere hat.

Ein weiterer und abschließender Versuch wurde in Anlehnung an ein Experiment von Monaco et al. (142) durchgeführt. In ihm sollte geprüft werden, ob sich auch durch mehrfache Injektionen semiallogener Zellen bei thymektomierten bzw. nicht thymektomierten, mit A L S vorbehandelten Mäusen eine spezifische Toleranz erzeugen läßt. Monaco verwendetet für seine Untersuchungen thymektomierte Ajax-Mäuse, die an 7 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,25 ml ALS i.p. erhalten hatten. Als Spender semiallogener Zellen dienten (C3H/He x Ajax) F1-Tiere. 22 von insgesamt 26 Ajax-Empfängertieren trugen auch noch am 100. Tag ein positi-

ves C3H/He-Hauttransplantat und waren, wie ein Transplantationstest nachwies echte Chimären.

X. Die zelluläre Imunität thymektomierter und nicht thymektomierter CBL-Mäuse nach ALS-Therapie und Transplantation lymphohämopoietischer Zellen von F1-Spendern

16 thymektomierte CBL-Mäuse erhielten im Abstand von 14 Tagen 2 mal an 6 aufeinanderfolgenden Tagen ALS (Pool 61) s.c.. 5 Tage nach der letzten Seruminjektion wurden ihnen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 100 x 10^6 CBLxCBA (F1) Milz- und Lymphknotenzellen in die Schwanszvene gespritzt. Am Tage nach der letzten Zellinjektion erhielten die Zellempfänger ein CBA-Hauttransplantat. In einer Kontrollgruppe wurden 10 nicht thymektomierte, im Übrigen ebenso behandelte CBL-Mäuse mitgeführt (Abb.19).

Dieser Versuch erinnert an den in Abschnitt VII beschriebenen Parabioseversuch, in dem semiallogene Parabiosen aus CBL- und CBLxCBA-Tieren untersucht worden waren. Diente den CBL-Mäusen dort der Blutzellpool des unbehandelten F1-Parabionten als Spender lymphohämopoietischer Zellen und damit gleichzeitig als "Spender" von Gewebsantigenen, waren es hier Milz und Lymphknoten des F1-Tieres.

4 CBL-Mäuse der thymektomierten Gruppe starben noch während der Zellinjektionen, 12 Tieren wurde ein CBA-Hautstück transplantiert. Bis zum 56. Tag wurden alle Transplantate abgestoßen. In der nicht thymektomierten Kontrollgruppe starben 3 CBL-Mäuse nach Zellinjektion, die übrigen 7 erhielten ein CBA-Hauttransplantat. Bei 3 Tieren erfolgte die Abstossung zwischen dem 15. und 21., bei 2 zwischen dem 22. und 28. und bei den restlichen 2 zwischen dem 29. und 35. Tag (Abb.20).

Die Ergebnisse zeigen, daß es - im Gegensatz zu Monaco's Untersuchungen mit Ajax- und C3H/He x Ajax-Mäusen - nicht gelang bei intensiv immunsupprimierten CBL-Mäusen durch wiederholte i.v.-Gabe einer großen Zahl (CBLxCBA) F1-Lymph- und Milzzellen eine länger dauernde, unspezifische oder spezifische Toleranz gegenüber den Transplantationsantigenen des CBA-Parentaltieres zu erzielen. Im Einzelnen führt ein Vergleich der in Abb.20 aufgeführten CBA-Hauttransplantatüberlebenszeiten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL-Mäusen zu folgender Beurteilung:

a) Die Überlebenszeit von CBA-Hauttransplantaten war bei thymektomierten, ALS- behandelten Empfängertieren nach 3-maliger Injektion von je 100 mal 10^6 CBLxCBA- Milz- und Lymphknotenzellen länger als bei nic

thymektomierten, ebenso behandelten CBL-Mäusen (Kontrollgruppe).

b) Wurden bei thymektomierten und 2 mal je 6 Tage mit ALS behandelten CBL-Mausen CBA-Hauttransplantatüberlebenszeiten von mehr als 100 Tagen beobachtet, betrugen die Überlebenszeiten bei entsprechend vorbehandelten CBL-Mausen nach zusätzlicher Injektion von CBLxCBA-Zellen max. 50 bis 56 Tage. Selbst wenn man berücksichtigt, daß in einem Fall (Exp. V) zwischen der letzten Seruminjektion und der Hauttransplantation 8 Tage liegen, im anderen Fall (Exp.IV) höchstens 1 Tag liegt, sind die Transplantatüberlebenszeiten bei Hautempfängern, die vorher F1-Zellen erhalten hatten, erheblich kürzer. In allen Fällen stießen jedoch die Empfänger von F1-Zellen die transplantierte CBA-Haut später ab als unbehandelte CBL-Mäuse.

c) Die P a r a b i o s e thymektomierter, ALS-behandelter CBL-Mäuse mit unbehandelten CBLxCBA-Tieren (Exp.VII) bzw. mit nicht thymektomierten, ALS- behandelten CBA-Tieren (Exp.VIII) führte, anders als die Zellinjektion bei entsprechend vorbehandelten CBL-Mäusen bei einem Teil der Parabionten zur Etablierung einer spezifischen Toleranz.

DISKUSSION

Die Ergebnisse von Versuch I zeigen, daß die Parabiose zweier nicht vo behandelter, stark gewebsincompatibler Mäuse eine hohe Partnerletalität zur Folge hat, die in der 2 Woche nach Parabiosierung einsetzt. Ein sp zies-spezifischer Unterschied in der Sterblichkeit war deutlich feststellbar: in der Mehrzahl der Fälle starben die CBL-Partner an den Fol gen der Parabiosierung. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der vo Nacic et al. (148). Sie fanden, daß nach Parabiosierung von C57Bl/6-un CBA/T6-Mäusen die sog. Parabiosekrankheit bei den CBL-Partnern auftrat an deren Folgen diese zumeist starben. Die CBA-Mäuse zeigten die Krank heit nicht. Die Parabiosekrankheit, charakterisiert durch Wasting, Dia rhoe, Anämie, allgemeine Lymphatrophie und eingeschränkte immunologisc Reaktionsfähigkeit - Symptome, die denen der Sekundärkrankheit nach Kn chenmarktransplantation sehr gleichen (21,23,147) - ist dann zu sehen, wenn genetisch unterschiedliche Tiere operativ zur Parabiose verbunden werden. Als ihre Ursache wurde seit der Entdeckung des Syndroms ein im munologischer Mechanismus vermutet.

Aus Untersuchungen von Eichwald und Lustgraf (58) und Binhammer (34 geht hervor, daß sich 3 bis 4 Tage nach Parabiosierung Gefäßanastomose zwischen beiden Partnern ausbilden, die eine Kreuzzirkulation des Blut von einem zum anderen Parabionten ermöglichen. Intensität und Dauer ei ner Kreuzzirkulation stehen in enger Beziehung zur genetischen Unterschiedlichkeit der Partner (121). Syngene Parabionten entwickeln nach Parabiosierung eine zunehemende Kreuzzirkulation, die um die 3. Woche ihre maximale Intensität erreicht. Der intensivste Zellaustausch zwischen gewebsverträglichen Partnern findet innerhalb der ersten 4 Parabiosewochen statt (65) und bleibt nach dieser Periode auf einem verhäl nismäßig stabilen Niveau. Während Milz und Lymphknoten bis zu 50% Zellen vom jeweiligen Partner enthalten, sind in Thymus 10 bis 15% und in Knochenmark durchweg weniger als 10% Partnerzellen zu finden (untersuc an CBA- CBA/T66-Parabiosen). Geringe Antigenunterschiede (z.B. Y-Chromosom bedingt) haben kaum einen Einfluß auf die Ausbildung der Kreuzzi kulation, während starke Gewebsantigendifferenzen (H2-Incompatibilität bei Mäusen) nur die vorübergehende, wesentlich schwächere Kreuzzirkulation zulassen (121).

Nacic et al. (148) wies mit Hilfe der Chromosomenanalyse nach, daß

Milz und Lymphknoten von CBL- CBA-Parabionten Zellen vom jeweiligen Partner existierten. Als auffallendstes Merkmal fand er eine deutliche Asymmetrie der Zellverteilung. Während ind der CBA-Maus kaum CBL-Zellen zu finden waren, enthielt die Milz der CBL-Partner, die wie erwähnt meist an der Parabiosekrankheit starben einen relativ hohen Anteil an CBA-Zellen. Die histologische Untersuchung von Milz und Lymphknoten ergab, daß die Milzen von CBL-Mäusen ihre normale Struktur verloren hatten und von kleinen Lymphzyten entleert waren. Lymphfollikel waren kaum sichtbar, dagegen eine deutliche Proliferation von Reticulumzellen. Der Lymphknotenhistologie entsprach die Histologie der Milz. Eine geringgradige Lymphoidatrophie konnte auch bei den klinisch normal erscheinenden CBA-Partnern gefunden werden. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, daß die Parabiosekrankheit Folge einer wechselseitigen "Interaktion von "Spender-" und "Empfänger"-Zellen im Empfänger ist, die eine massive Zerstörung des Lymphgewebes mit nachfolgender Lymphatrophie verursacht. Die Lymphatrophie allein kann jedenfalls nicht in allen Fällen von Parabiosekrankheit als Todesursache angesehen werden, da auch Parabionten bei Lymphatrophie überleben. Eine schwere Anämie, bedingt durch Immunhämolyse (40,166), kann offensichtlich ebenfalls zum Tode der Parabionten führen (147). Warum im Parabiosesystem die CBL-Maus die Funktion eines Empfängers und die CBA-Maus die eines Spenders entwickelt, bleibt offen. Ihr mag ein spezies-spezifischer Unterschied in der immunologischen Reaktionsfähigkeit zu Grunde liegen (s. auch 2,19,67,81). Die zelluläre Immunreaktion einer CBL-Maus gegenüber CBA-Gewebsantigenen, gemessen an der Überlebenszeit von Hauttransplantaten ist intensiver als die eines CBA-Tieres gegenüber CBL-Antigenen.

Die sogenannte Einweg-Parabiose, die eine Vereinfachung des gewebsunverträglichen Parabiosesystems darstellt, erlaubt die Untersuchung der Parabiosekrankheit bei Berücksichtigung der immunologischen Reaktionsfähigkeit nur eines Partners.

Unter Einweg-Parabiose ist ein Parabiosesystem zu verstehen, das aus einem Parental- und einem F1-Hybrid-Partner besteht. Es handelt sich dabei um ein semiallogenes System, da das F1-Tier, das über die elterlichen Gewebsantigene verfügt zu keiner immunologischen Reaktion gegen diese fähig ist, das Parental-Tier jedoch gegen die im Hybriden vorhandenen Gewebsantigene des anderen Elternteils immunologisch reagiert. Mit anderen Worten im Parental-Hybrid-Parabiosesystem besteht eine Antigen-Stimulation nur für einen Partner, das Parentaltier.

Die Symptome der Sekundärkrankheit nach Knochenmarktransplantation (s Einleitung) im gewebsunverträglichen Spender-Empfänger-System sind - wie inzwischen mit Sicherheit angenommen werden kann - Ausdruck einer GvH-R, einer Reaktion von Spenderlymphozyten gegen das, fremde Antigene tragende Empfängergewebe (21,50,195).

Untersuchungen über die Parabiosekrankheit legen den Schluß nahe, da sie und ihre Symptome - denen der Sekundärkrankheit sehr ähnlich - ebe falls durch eine GvH-R hervorgerufen werden (40,97). Die für ein Trans plantat gegen Wirtreaktion notwendige Übertragung immunkompetenter Lym phozyten auf den anderen Partner wird durch die Zirkulation des Parabi sesystems gewährleistet. Die selektive F1-Hybrid-Mortalität im semial logenen Parabiosesystem zeigt eine enge Beziehung zur Histocompatibili tät: je ausgeprägter die Antigendifferenz desto höher die Mortalität als Folge der Parabiosekrankheit (121).

Sind die semiallogenen Parabionten H2-incompatibel, sterben die Hy brid-Partner in der 2. Woche nach Parabiosierung an den Folgen der Pa rabiosekrankheit. Werden die Paare vorzeitig, d.h. nach 6 oder 10 Tage getrennt, zeigen die F1-Partner die typischen Zeichen der sog. homolo gen Krankheit (20, beobachtet nach Injektion von mehr als 10^7 P-Lymphze len in F1-Mäuse) wie Schwächlichkeit, gekrümmte Haltung, Haarausfall, Diarrhoe und Dermatitis (40) und sterben innerhalb der folgenden 4 Wo chen. Nach Nisbets (151) Untersuchungen an H2-histoincompatiblen, semi allogenen Parabiosen weisen die Milzen der F1-Partner (CBAxC3H) bei Chromosomenzellanalysen konstant Parentalzellen auf - zum Teil 50% und mehr - in den Milzen der CBA-Parentalpartner dagegen sind keine Hybrid zellen zu finden, weder in der ersten noch in späteren Parabiosewochen. Als ein weiterer Hinweis auf die i m m u n o l o g i s c h e Ursache der Parabiosekrankheit muß die Beobachtung gewertet werden, daß Paren talpartner die Parabiosephase uberleben und eine Parabiosekrankheit be ihnen nicht festgestellt werden konnte (40,97). Die Parabiose mit dem F1-Partner kann jedoch auch zu einigen Veränderungen im Parentaltier führen: zu vorübergehender Alopezie, Gewichtsverlust, selbst noch nach Trennung, Granulozytose und Lymphopenie sowie einer Thrombozytopenie b gleichzeitiger Reticulozytose (40). Daß die Parabiosekrankheit nicht durch den Parabioseprozeß selbst verursacht wird, findet nicht zuletzt Bestätigung in Kontrollversuchen mit syngenen Partnern (Letalität höch stens 10%), die weder klinische noch hämatologische Anzeichen einer Pa rabiosekrankheit zeigten (40,121).

McBride et al. (121) fanden nach Vorsensibilisierung des Parental partners durch Gewebsantigene des F1-Tieres vor der Parabiosierung ein in Symptomen und Letalität signifikant intensivierte Parabiosekrankhei wenn die Präimmunisierung und Parabiose im H2-compatiblen System statt fanden. Ihre Beobachtung über den Effekt einer Immunisierung auf die I tensität der Parabiosekrankheit entspricht der Beobachtung von Simonse

(194) und Loutit (114) über die intensivierende Wirkung der Immunisierung eines Milzzellspenders mit Zellen des prospektiven Empfängers auf die GvH-R im H2-identischen Empfänger-Spender-System.

Das Überleben eines Parabiosepaares in Experiment I mag von einer frühen intensiven Immunreaktion beider Partner gegenüber dem Gewebe des anderen Partners herrühren. Nach rascher, gegenseitiger Sensibilisierung könnte ein durch diese Reaktion verursachter, beschleunigter Gefäßverschluß mit Abstoßungsreaktion die Ausbildung funktionsfähiger Gefäßanastomosen frühzeitig verhindern. Der Immunstatus der Parabionten bleibt so abgesehen von der spezifischen Partnersensibilisierung unbeeinflußt.

Wurden beide Partner vor Parabiosierung thymektomiert, zeigten sie nach Trennung hinsichtlich ihrer Immunreaktion gegen Kreuz- und Fremdtransplantate keinen Unterschied zur nicht thymektomierten Kontrollgruppe. Es überlebten jedoch 6 thymektomierte Paare (von 10) im Vergleich zu nur einem Paar in der nicht thymektomierten Gruppe. Der Unterschied in der Parabiosesterblichkeit ist kaum auf ein immunologisches Geschehen zurückzuführen. Der Thymus spielt für die Ausbildung immunologischer Kompetenz eine wesentliche Rolle (s.Einleitung): neonatal thymektomierte Mäuse zeigen immunologische Defekte (133), die die zelluläre Immunität betreffen. Letal bestrahlte Mäuse benötigen, nachdem ihnen syngenes Knochenmark transplantiert wurde den Thymus zur Wiederherstellung der vollen Immunkompetenz und Funktion ihres lymphopoietischen Gewebes (44, 130). Auch der Thymektomie erwachsener Tiere folgt eine Reduktion der Lymphzellpopulation (126), die allerdings erst viele Wochen später auftritt und nach 12 Monaten zu einem Abfall der Lymphzellzahl auf ca. 33 % des Normalwertes führt (136). Sie ist zumindest für die ersten postoperativen Wochen nicht mit einem immunologischen Defekt verbunden. Jeejeebhoy (92) fand, daß Ratten, die 102 Tage und mehr vor der Transplantation allogener Haut thymektomiert worden waren, die Transplantate erheblich länger trugen als scheinthymektomierte Kontrolltiere; ähnliche Beobachtungen macht Miller an thymektomierten Mäusen (131). Die Immunreaktion gegen Schaferythrozyten ist bei Mäusen, thymektomiert im Erwachsenenalter erst 6 bis 9 Monate nach dem Eingriff deutlich vermindert (132).

Die Parabiosedauer einer 2. und 3., wiederholten Parabiose derselben Partner, bestimmt durch immunologische Trennung, ist bei thymektomierten Paaren (Thymektomie 3 Wo. vor der ersten Parabiosierung) im Vergleich zu nicht thymektomierten Partnern nur unwesentlich verlängert (146).

Die Rolle des Thymus innerhalb des Immunsystems beschränkt sich dem-

nach nicht auf eine Reifungsphase des Systems in der Embryonalzeit und der unmittelbaren Postnatalperiode oder auf den Prozeß der Wiedergewinnung immunologischer Kompetenz nach Knochenmarktransplantation. Der Thymus beeinflußt die Entwicklung einer bestimmten Lymphzellpopulation auch in erwachsenen und immunologisch "reifen" Tieren (136). Da die Folgen einer Erwachsenenthymektomie (Abnahme der Zahl der zirkulierenden Lymphozyten und Beeinträchtigung der zellulären Immunkompetenz) relativ spät erkennbar sind (92,126,132) muß es sich bei den unter Thymuseinfluß reifenden und an der zellulären Immunreaktion teilhabenden Lymphozyten um langlebige Zellen handeln (92).

Ist uns die Bedeutung des Thymus als wesentliches Organ in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der vollen immunologischen Reaktionsfähigkeit bekannt (41,92,126,129,130,133,135,165) so fehlt uns immer noch ein umfassendes Verständnis seiner F u n k t i o n , die oft nur durch die Beobachtung der Thymektomiefolgen oder der Wirkung einer Thymustransplantation unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beschrieben werden kann. Viele Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß er seine Funktion in wenigstens 2 Eigenschaften ausübt. Einmal als endokrines Organ, das einen bisher nicht rein isolierten und identifizierten hormonalen Faktor produziert, zum anderen als Gewebe von spezifischer Struktur mit spezifischen "Environment". Osoba und Miller (159) zeigten, daß Thymustransplantate eingeschlossen in zellundurchlässige Milliporekammern die zelluläre Immunkompetenz neonatal thymektomierter Mäuse teilweise wieder herstellen konnten und vermuteten, daß das in den Kammern weiterlebende "epithelial-reticuläre Gewebsnetz des Thymus" über einen hormonalen Faktor Lymphoidzellen beeinflußt.

Syngene Thymustransplantate waren unfähig, neonatal thymektomierten Mäusen ihre immunologische Kompetenz wieder zu vermitteln, wenn sie vor Transplantation mit hohen Dosen (2000 r) bestrahlt wurden. Eine Bestrahlung mit 500 r, die zur Zerstörung der im Thymus vorhandenen Lymphzellen führte, hatte keine negative Wirkung auf die restaurative Funktion syngener Thymustransplantate (51). Der Befund läßt insofern umso mehr an einen hormonalen Faktor denken, als die Architektur der hochbestrahlten Thymustransplantate 15 bis 20 Tage nach der Transplantation wieder normal ist. Andere Befunde, die auf die Existenz eines "Thymushormons" hinweisen lieferten Hallenbeck et al. (80) in Experimenten mit Mäusen, in denen sie neonatal thymektomierten Tieren (xenogene) Rattencarcinomzellen injizierten. Ein Teil dieser Mäuse stieß den Tumor ab, wenn ihnen 1 Woche vor Tumortransplantation syngene Thymi in Milliporekammern i.p. implantiert worden waren. "Thymosin", aus Kalbsthymusgewebe gewonnen, hat einen lymphozytopoietischen Effekt, reduziert neonatal thymektomierten Mäusen injiziert das Auftreten des Wasting-Syndroms und führt teil-

Weise zu einem normalen histologischen Erscheinungsbild ihres lymphatischen Gewebes. "Thymosin", neonatal thymektomierten oder erwachsenen Mäusen, die thymektomiert und letal bestrahlt wurden und anschließend syngenes Knochenmark erhielten, gegeben, beeinflußt nicht ihre herabgesetzte Fähigkeit zur Immunantwort auf das Antigenschaferythrozyten (235

Knochenmarkzellen sind auch nach Inkubation mit einem zellfreien Thymusextrakt nicht zu einer GvH-R fähig (197). Nach Inkubation mit dem Hormon zeigen Zellen aus dem Knochenmark jedoch für T-Zellen charakteristische Merkmale (9).

Zusammengesehen deuten diese Befunde in Übereinstimmung mit Versuchsergebnissen Stutmans et al. (208,209) darauf hin, daß der Thymus eine "humorale" Wirkung auf bestimmte lymphatische Zellen ausübt, auf Zellen die möglicherweise bereits durch unmittelbaren Thymuseinfluß geprägt sind (z.B. während einer Passage durch das Thymusgewebe). Der Effekt mag in einer Stimulation zur Proliferation (235) und/oder Differenzierung (9) dieser Zellen liegen (208). Es steht nicht fest, ob der Differenzierung eine Reifung im funktionellen Sinne entspricht. Da es bisher nicht überzeugend gelang, die beschriebene Immundefizienz nach neonataler Thymektomie mit Hilfe von Thymusextrakten oder Thymustransplantaten in Milliporekammern erfolgreich zu behandeln (159,208), kann die Bedeutung des Thymus in einer endokrinen Funktion allein jedoch nicht liegen. Zur Differenzierung pluripotenter,"primitiver", lymphohämopoietischer Zellen in reife, thymusabhängige Zellen bedarf es offensichtlich nicht oder nicht nur eines Thymushormons, sondern auch der u n m i t t e l b a r e n "Vermittlung" des Organs (197,208,209). Die Befunde zahlreicher Untersuchungen über die Besiedlung lymphatischer Gewebe durch Lymphozyten sowie über das Verteilungsmuster der verschiedenen Lymphoidzellen deuten auf eine eng an das Organ gebundene, spezifische, lokale Thymusfunktion hin.

Ford und Micklen (64) zeigten mit Hilfe von Chromosomenmarkern, daß Knochenmark die Zellen enthält, die den Thymus bestrahlter Knochenmarkempfänger wiederbesiedeln. Lymphzellen (von Lymphknoten und Thymus) wandern nach Injektion nicht in den Thymus (156), sondern zu den Lymphknoten, in denen sich ebenso Zellabkömmlinge aus dem Knochenmark ansiedeln können (64). Die Zellen, die die durch Bestrahlung zerstörte Zellpopulation des Thymus replazieren, können bereits wenige Stunden nach Knochenmarktransplantation im Thymus gesehen werden (158) und stammen wahrscheinlich von nur wenigen "Vorläuferzellen" ab (231). Sie sind anfänglich in der Lage wieder ins Knochenmark zurückzukehren, verlieren diese Eigenschaft jedoch mit zunehmender Verweildauer im Thymus. Der Zeitpunkt des Verlustes fällt mit der Ausbildung von thymusspezifischen Antigenen an der Zelloberfläche dieser Zellen im Thymus zusammen, über die "normale" Knochenmarkzellen nicht verfügen (158). Aus den Untersu-

chungen von Grder und Waksman (157) an semiallogenen Rattenchimären geht hervor, daß die aus dem Knochenmarktransplantat stammenden Zellen im Thymus erst als große Lymphozyten mit den Spender-Gewebsantigenen auf ihrer Zelloberfläche auftreten. Nach fortgeschrittener Teilung und Differenzierung lassen sich kleine und größere Lymphozyten mit spezifischem Thymusantigen entdecken. Es ist nicht klar, ob es sich bei den Zellen, die den Thymus besiedeln können um multipotente Stammzellen oder um eine bereits für die Entwicklung zu immunologisch kompetenten T-Zellen "vorbestimmte" Population handelt. El Arini und Osoba (52) fordern die Existenz spezifischer Vorläuferzellen, die sich durch physikalische Eigenschaften, durch die Unfähigkeit zur Immunreaktion und dem Mangel an Theta-Antigen von reifen thymusabhängigen oder -abstammenden Zellen unterscheiden. Dukor et al. (51) fanden, daß in syngenen Thymustransplantaten von der 3. Woche post transpl. an Empfängerzellen auftreten, die nach weiteren 21 Tagen die ursprüngliche Thymusspenderpopulation völlig ersetzt hatten. Es darf als gesichert gelten, daß nicht der Thymus, sondern das Knochenmark die eigentliche "Quelle" der thymusabhängigen Lymphozyten ist und im Thymus ein wesentlicher Reifungsschritt lymphoider Zellen auf dem Wege zur weiteren Differenzierung und Erlangung immunologischer Kompetenz statt findet.

Es gelang Weissman (233) durch intrathymale Markierung von Thymuslymphozyten mit Thymidin und Adenosin nachzuweisen, daß Thymuszellen den Thymus verlassen und zu Lymphknoten und Milz wandern. Sie lassen sich exakt in den Arealen von Lymphknoten und Milz wiederfinden, die Parrott et al. (163) als thymusabhängige Felder charakterisierten und die dem Pool der zirkulierenden Lymphozyten als Quelle dienen. Die Chromosomenanalyse der Zellen in den verschiedenen lymphatischen Geweben und dem Knochenmark nach Implantation eines CBA-T66-Thymus in eine thymektomierte, syngene Strahlenchimäre (CBA) gab auch quantitative Anhaltspunkte über die Verteilung ausgewanderter Thymuszellen auf das periphere Lymphgewebe und Blut (45).

Die Entdeckung, daß nahezu alle Thymuslymphozyten und bestimmte Lymphozyten im peripheren Lymphgewebe und Blut ein spezifisches Isoantigen, das Thetaantigen tragen (167) erlauben eine systematische Analyse der Zellpopulation im peripheren Lymphgewebe. Indem sie das Thetaantigen als Erkennungsmerkmal dieser Lymphozyten benutzten, fanden Raff und Wortis (168), daß die Zellen mit dem Thetaantigen auf der Zelloberfläche die thymusabhängige Lymphzellpopultation repräsentieren. Die gleiche Untersuchungsmethode ließ außerdem eine klare, quantitative Bestimmung der Verteilung von T-Zellen (prozentualer Anteil an der gesamten Lymphzellzahl) auf das periphere Lymphgewebe und den zirkulierenden Lymphozytenpool (Blut und ductus thoracicus) zu und bestätigte, daß die Entwicklung des peripheren Lymphgewebes weitgehend vom Einstrom thymusabhängiger Lymphozyten abhängt (170). Die sog. B-Zellen (=bone marrow derived) sind

thymus u n abhängige Zellen d.h. ihre Entwicklung aus Zellen des Knochenmarks bedarf nicht des Thymuseinflusses (136,137). Sie tragen kein Thetaantigen (169), sind im Gegensatz zu T-Zellen zur Antikörperbildung fähig (135,137, 138, 154). Sie werden in den thymusunabhängigen Arealen des perpheren Lymphgewebes gefunden, das sind Lymphfollikel und periphere Regionen der weißen Milzpulpa, Follikel und Mark der Lymphknoten bzw. Follikel des gastrointestinalen Lymphgewebes (264). Es handelt sich bei den B-Zellen überwiegend um kurzlebige Lymphozyten (44), die, im Gegensatz zu den T-Zellen, kaum rezirkulieren (87). Claman et al. (39) sowie später Miller und Mitchell (135,137,138,154), Nossal et al. (154) zeigten in Basisexperimenten, daß die Immunreaktion gegen das Antigen Schaferythrozyten ein Zusammenwirken von B- und T-Zellen erfordert, wobei die B-Zellen nur in Anwesenheit der antigenreaktiven T-Zellen Antikörper bilden. Man weiß heute, daß die B-Zellen die Hilfe von T-Zellen zur "thymusabhängigen" Antikörperproduktion gegen eine Vielzahl anderer Antigene benötigen.

Da im vorliegenden Experiment I/2 beide Parabiosepartner zur gleichen Zeit vor Parabiosierung thymektomiert worden waren, unterlagen sie vergleichbaren Bedingugen. Ein immunologisches Geschehen als Ursache für die hohe Überlebensrate der thymektomierten Parabiosen kann nur dann angenommen werden, wenn der Thymus in irgend einer Weise die Ausbildung des Empfänger-Spenderverhältnisses, das bei CBL-CBA-Parabiosen beobachtet wird (s. Exp. I/1 und 148), beeinflußt - im syngenen Parabiosesystem hat die Thymektomie beider Partner vor Parabiosierung kaum eine Wirkung auf den Zellaustausch, verglichen mit syngenen, nicht thymektomierten Parabiosen (65) - und/oder wenn die Thymektomie mit stammesspezifisch unterschiedlichen Folgen für das Immunsystem verbunden ist, im Sinne einer immunologischen Gleichstellung von CBL- und CBA-Partner, so daß es nicht zur beschriebenen Empfänger-Spendersituation (148) mit ihren beschriebenen Folgen kommt. Ein derartiger Effekt der (Erwachsenen-) Thymektomie auf die Parabionten und Parabiose ist kaum mit dem bekannten s p ä t e n Thymektomiefolgen in Einklang zu bringen, noch weniger jedoch mit der an Hand von Transplantatüberlebenszeiten beobachteten, unveränderten Immunkompetenz der Partner nach ihrer Trennung. Eine frühzeitig einsetzende immunologische Abwehrreaktion mag auch in thymektomierten Parabionten - bei gleichzeitiger Sensibilisierung - die Ausbildung einer Kreuzzirkulation verhindert haben, so daß das unterschiedliche Verhältnis von 6 überlebenden, thymektomierten Parabiosepaaren zu einem überlebenden "normalen" Paar (von jeweils 10 Parabiosen) wohl auf variierende, unspezifische Bedingungen zurückzuführen ist. Zu solchen Bedingungen, die im Zusammenhang mit dem bedeutenden "Parabiosestress" zu

sehen sind, zählen Altersunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen m. unterschiedlicher physischer Kondition und Infektanfälligkeit.

In Experiment II/1 wurde die immunsuppressive Wirkung von heterologem ALS auf die zelluläre Immunität von CBA- und CBL-Mäusen getestet. Es zeigte sich, daß ALS in der hier beschriebenen Anwendungsweise (9 Tage tgl. 0,25 ml s.c. vor Antigengabe) die normale Abstoßungsreaktion gegen allogene Hauttransplantate deutlich verzögert. Das Resultat steht in Einklang mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Arbeiten, die die immunsuppressive Wirkung von ALS, gemessen an den Überlebenszeiten frei der Hauttransplantate beschreiben (107,185,239). Den Zeitpunkt der ALS-Gabe im Verhältnis zur Konfrontation mit dem Antigen (z.B. Hauttransplantat) kommt insofern Bedeutung zu, als eine maximale Unterdrückung der Immunreaktion durch Verabreichung des Serums v o r dem "Antigen-challenge" erreicht wird (116,141,185,239). Setzt die ALS-Behandlung gleichzeitig mit der Antigenkonfrontation ein, beobachtet man eine weniger wirksame Immunsuppression, die schließlich völlig verloren geht, wenn die Therapie mehrere Tage nach Antigenexposition begonnen wird (116, 185). Mit der Injektion mehrerer kleiner Einzeldosen von ALS läßt sich eine ausgeprägtere Immunsuppression erzielen, als mit der ein- oder zweimaligen Gabe größerer ALS-Mengen (109). Die Anordnung der vorliegenden Experimente folgt diesen Erkenntnissen.

Die immunsuppressive Wirkung von ALS konnte erheblich intensiviert werden, wenn die Tiere vor der 9-tägigen Serumtherapie thymektomiert wurden. Das Ergebnis bestätigt Befunde aus entsprechenden Versuchen mit Mäusen, Ratten und Hamstern (43,73,92,107,140,144,185). In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Monaco et al. (140) an thymektomierten, ALS-behandelten Ajax-Mäusen, verdoppelt die der ALS-Therapie vorangehende Thymektomie auch bei CBL-Mäusen die Überlebenszeit allogener Hauttransplantate, verglichen mit der Transplantatüberlebenszeit bei nicht thymektomierten, ALS-behandelten CBL-Tieren. CBA-Mäuse zeigten bei entsprechender Behandlung eine wesentlich länger anhaltende Immunsuppression als CBL-Mäuse. Die auffallenden Unterschiede im immunologischen Verhalten von CBL- und CBA-Mäusen, die auch hier nach identischer Behandlung zu beobachten waren, könnte wie bereits erwähnt auf der unterschiedlichen immunologischen Reaktivität der beiden Tierstämme beruhen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, faszinierte die Parabiose als ideales Versuchsmodell zur Induktion einer (spezifischen) Gewebstoleranz seit vielen Jahren. Bei den zahlreichen Untersuchungen über immunologi-

sche und hämatologische Merkmale von Parabiosen und Parabionten wurden fast ausschließlich Parental-Filial 1-Kombinationen oder Paare, die sic n i c h t im Hauptgewebsantigenlocus unterschieden, verwendet (40,121, 146,151,152,153,195).

Die Experimente III/1 und 2 zeigen die Wirkung von ALS bzw. Thymektomie und ALS auf die zelluläre Immunität homozygot allogener, H2-incompatibler Parabionten.

Zusammenfassend läßt sich an Hand der Ergebnisse sagen, daß die immunsuppressive Vorbehandlung der Parabionten die Parabiosesterblichkeit erheblich reduzierte, eine gute Kreuzzirkulation zwischen beiden Partnern ermöglichte (makroskopisch) und eine Sensibilisierung der Parabionten durch Partnerantigene verhinderte (keine second set Hauttransplantatabstoßung im Gegensatz zu den unbehandelten Parabionten in Exp. I). Klinisch konnte eine GvH-R oder chronische Sekundärkrankheit als Ausdruck einer Immunreaktion von Zellen des einen Partners gegen die Gewebsantigene des anderen Partners weder während der Parabiose noch nach Trennung beobachtet werden. Wie die Abstoßungsreaktion gegen die Hauttransplantate nach Parabiosetrennung erkennen läßt, ermöglichte die Parabiosierung von ALS-behandelten allogenen Partnern n i c h t die Ausbildung einer partnerspezifischen Toleranz. In der thymektomierten Parabiosegruppe konnten allgemein längere Hauttransplantatüberlebenszeiten beobachtet werden als in der nicht thymektomierten. Mäuse vom CBL-Stamm ließen wiederum nach identischer Vorbehandlung CBA-Transplantate rascher ab als CBA-Tiere CBL-Hauttransplantate. Die Interpretation der Ergebnisse erfordert eine genauere Erkenntnis der durch Thymektomie, ALS-Therapie un Parabiose geschaffenen Verhältnisse.

Gray et al. (79) demonstrierten (in vitro), daß die Inkubation von Mäusemilz- und -lymphknotenzellen mit heterologem ALS ungefähr 50% der Zellen töteten. Die Reaktion war komplementabhängig. Eine einzelne Injektion von 0,25 ml Kaninchen-anti-Mäuse-Lymphozytenserum verursachte eine intensive Abnahme der peripher zirkulierenden Lymphozyten auf ca. 20% der ursprünglichen Menge,die innerhalb der ersten 4 Stunden nach Injektion auftrat. 10 Tage später waren bei wieder normaler Leukozytenzahl die Lymphozyten immer noch um ca. 40% vermindert. Die Zahl der Erythrozyten blieb unbeeinflußt. Von den mit ALS behandelten Tieren bildeten weniger als die Hälfte Antikörper in sehr geringen Titern gegen das Kaninchenglobulin.

Aus Untersuchungen von Taub et al. (211) und Denman et al. (49) geht hervor, daß ALS seine Wirkung in erster Linie auf die langlebigen, zirkulierenden Lymphozyten ("thymusabhängig") ausübt. Lymphozyten inner-

halb des lymphatischen Gewebes (Milz,Lymphknoten, Thymus) erweisen sich gegenüber ALS als weniger empfindlich (211), vermutlich deshalb, weil das Antiserum nur zu einem geringen Grade in Milz, Lymphknoten und Thymus eindringt (49). Wie Martin et al. (116) und Jeejeebhoy (93) zeigten handelt es sich bei den von einer ALS-Therapie betroffenen Lymphozyten vornehmlich um thymusabhängige, antigenreaktive Zellen. Es kann jedoch auch eine Inaktivierung von knochenmarkabhängigen oder B-Zellen beobachtet werden (93), je nach Art der Serumzubereitung. Martin und Miller verwandten für die Kaninchenimmunisierung Thymozyten, Jeejeebhoy Thymozyten und Zellen aus Lymphknoten, die ein Gemisch aus T- und B- Zellen darstellen (170). Das in den vorliegenden Experimenten verwendete ALS wurde in ähnlicher Weise wie das Jeejeebhoys hergestellt.

Bei der histologischen Untersuchung bietet das lymphatische Gewebe mit ALS behandelter Mäuse (9 mal 0,25 ml in 3 Wo.) folgendes Bild: Der Thymus ist frei von lymphoiden Zellen, die epithelialen Elemente sind jedoch wohl erhalten. Die Lymphknoten und in geringerem Ausmaß die Milz lassen bereits am 1. Tag nach der letzten ALS-Gabe kaum noch Lymphozyten und Keimzentren sondern nur Stroma und reticuläre Elemente erkennen. Die ausgeprägte Lymphopenie besteht für ungefähr 2 Wochen. D r e i Wochen nach Ende der Serumbehandlung beginnt die Wiederbesiedlung der Lymphknoten, nach 4 Wochen sind schmale Keimzentren mit vereinzelten Lymphozyten zu sehen. Erst nach 6 Wochen findet man wieder normale Lymphozytenzahlen in den Lymphknoten bzw. in der Milz. Taub et al. (212) sowie Turk et al. (221), die in ihren Experimenten mit Anti-t h y m o zytenserum arbeiteten, fanden die histologischen Veränderungen von Lymphknoten und Milz serumbehandelter Mäuse bzw. Meerschweinchen im Wesentlichen auf die thymusabhängigen Zonen beschränkt. Die Lymphknoten waren vor allem paracortical von Lymphozyten entleert; in der Milz fehlten die kleinen Lymphozyten in den periarteriolären Regionen und in allen Lymphfollikeln; das Knochenmark zeigte nur geringe Veränderungen im Sinne einer mäßigen erythroiden Hyperplasie und geringradigen Verminderung kleiner Lymphozyten. Im Gegensatz zu Gray et al. (79) beschrieben Taub et al. (212) die Histologie des Thymus als normal. Die Dauer der histologisch erkennbaren Veränderungen nach ALS-Therapie stimmt in beiden Untersuchungen überein. Nach ALS-Behandlung reflektiert der Anteil der peripheren Lymphozyten an der gesamten weißen Blutzellenzahl die histologische Aktivität in den Lymphknoten (144), das Wiederauftreten einer normalen Lymphknotenhistologie korreliert mit Wiedererlangung der immunologischen Kompetenz (183). D.h., daß eine Abstoßung fremder Hauttransplantate nach Immunsuppression durch ALS mit der Erholung von der Lymphopenie einsetzt.

Die Bedeutung des Thymus für die Wiedererlangung der Immunkompetenz nach einer ALS-Behandlung kann an deren eindrucksvollen Verzögerung

nach zusätzlicher Thymektomie vor Serumtherapie ersehen werden (140, 185,92). Grad und Dauer der beschriebenen Lymphopenie im Blut und in den Lymphorganen erreichen in thymektomierten und ALS-behandelten Tiere annähernd zweifache Werte (185). Die Reimplantation von Thymusgewebe in erwachsene, thymektomierte und ALS-behandelte Mäuse reduziert deutlich den "Verstärkungseffekt" der Thymektomie auf die immunsuppressive Wirkung von ALS (107,185). ALS vermittelt seinen immunsuppressiven Effekt, als dessen morphologisches Equivalent die beschriebene Lymphopenie und das Verschwinden der Lymphozyten aus den lymphatischen Geweben anzusehen sind, durch seine zytotoxische Wirkung auf die peripher zirkulierenden Lymphozyten(107,116,211,212). Die mit einer ALS-Injektion gegebenen Antilymphozyten-Antikörper werden von zirkulierenden Lymphozyten absorbiert. Die Entfernung des Antikörper-Lymphozyten-Komplexes erfolgt dann über das RHS (101). Neben seiner zytotoxischen Wirkung scheint das ALS auch ein unspezifisch stim-ulierenden Effekt auf Lymphozyten oder deren noch "unreifen" Vorläuferzellen zu haben (48,107,108); die sog. "sterile Aktivierung" durch das Serum führt zu einer Lymphoblastenbildung und Zellteilung, die nicht in Verbindung mit einer spezifischen immunologischen Reaktion steht.

Knochenmarkzellen werden durch eine in vitro Behandlung mit ALS weitgehend zerstört, die Zahl funktioneller, hämopoietischer Stammzellen deutlich reduziert (124). In vivo sind vor allem z i r k u l i e r e n d e Stammzellen durch ALS betroffen, eine länger durchgeführte Serumtherapie (3 Wochen) kann jedoch auch den Anteil an hämopoietischen Stammzellen im K n o c h e n m a r k vermindern (103,124). Eine genauere Analyse der Wirkung einer ALS-Therapie auf das hämopietische Gewebe von Mäusen zeigte dessen lymphopenischen Effekt auch auf das Knochenmark, das Auftreten einer Erythroblastopenie im Knochenmark und Erythroblastose mit Plasmozytose in Milz, eine nur vorübergehende Verminderung der absoluten Zellzahl im Knochenmark, sowie eine Zunahme von Myelozyten in Knochenmark und Milz (176).

Zum Zeitpunkt der Parabiosierung sind beide Partner maximal immunsuppriniert, so daß sich innerhalb der ersten Tage eine gute Kreuzzirkulation ausbilden kann durch die ein Austausch aller Blutbestandteile zwischen den Partnern stattfindet. Ob eine Empfänger-Spender-Situation (148) mit bevorzugter Zirkulationsrichtung eintritt, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, erscheint aber auf Grund der Immunität der Tiere nach Trennung unwahrscheinlich. Der Parabiosezustand (21 Tage fällt zeitlich mit den Vorgängen zur Wiedergewinnung immunologischer Kompetenz nach ALS-Therapie zusammen, die bei nicht thymektomierten Pa-

rabionten in der 3. Parabiosewoche einsetzt. Hier besteht ein Unterschied zwischen thymektomierten und nicht thymektomierten Parabionten, denn durch die Thymektomie wird die Wiedererlangung der immunologischen Reaktionsfähigkeit nach ALS-Immunsuppression weit über den Parabiosezeitraum von 21 Tagen verzögert (107,185). Während der Erholungsphase nach der ALS-Therapie, einer Art immunologischer Reifung vom Zustand der Reaktionsunfähigkeit zu dem der Immunkompetenz sind beide Parabionten mit Partner-Antigenen überladen. Die Gegenwart der Antigene, vor allem in Form der Histocompatibilitätsantigene, könnte einerseits stimulierend auf den Erholungsprozeß wirken, d.h. Zellproliferation und Differenzierung von lymphoiden Zellen im immunkompetenten Lymphozyten beschleunigen, funktionell erkennbar an einer rascheren Wiedergewinnung der Immunreaktivität. Sie könnte andererseits diesen Prozeß verlangsamen, indem frisch gereifte Lymphozyten bei der Reaktion mit den im relativen Übermaß angebotenen Antigenen zu Grunde gehen (Immunparalyse). Wahrscheinlich treten beide Mechanismen gleichzeitig auf: Stimulation und "Verbrauch", die in einer Art Gleichgewicht stehen. Für eine derartige Verzögerungswirkung in der Wiedererlangung durch die Parabiose spricht der Befund, daß CBL-Mäuse sowohl nach ALS-Therapie als auch nach ALS und Parabiose die CBA-Hauttransplantate innerhalb des gleichen Zeitraums (28 Tage) abstoßen. Betrachtet man die Überlebenszeiten der Transplantate in Relation zum Tag der letzten ALS-Gabe so wird ersichtlich, daß der Abstoßungsprozeß bei den CBL-Parabionten im wesentlichen um den Parabiosezeitraum verzögert war. Bei CBA-Mäusen ließ sich dieses Phänomen nicht beobachten, vielleicht deshalb nicht, weil diese - wie an der Hautransplantatüberlebenszeit ersichtlich - schon nach einfacher ALS-Behandlung ihre Immunkompetenz später wiedererlangen als CBL-Mäuse. Die Thymektomie der CBL-Partner vor ALS-Behandlung und Parabiose hat lediglich einen verzögernden Effekt auf die Wiedergewinnung der immunologischen Kompetenz, ähnlich wie bei nur mit ALS-behandelten CBL-Mäusen. Auch hier ist der absolute Zeitraum vom Tage der letzten ALS-Gabe bis zum Tage der Transplantatabstoßung gerade um die Parabioseperiode verlängert, verglichen mit der Überlebenszeit von CBA-Hauttransplantaten bei thymektomierten, ALS-behandelten Tieren.

Eine offensichtlich s t i m u l i e r e n d e Wirkung ist die Parabiose auf die Wiedergewinnung der Immunkompetenz von CBA-Mäusen nach Immunsuppression durch Thymektomie und ALS aus. Während Tiere von diesem Stamm nach Thymektomie und ALS-Therapie CBL-Hauttransplantate teilweise länger als 150 Tage trugen, erlangten alle thymektomierten, ALS-

behandelten CBA-Mäuse nach Parabiose mit CBL-Tieren ihre Immunkompetenz wieder. Wie aus den Überlebenszeiten der Partnerhauttransplantate nach Parabiosierung ersichtlich ist, konnte durch die Vorbehandlung der Partner mit ALS (Exp. III/1,2) die gegenseitige durch Parabiose normalerweise bedingte Partnersensibilisierung (s. Exp. I) in allen Fällen verhindert werden. Die Parabionten trugen die Partnerhauttransplantate länger als normale CBL- und CBA-Mäuse ihre Kreuztransplantate. Wären die Tiere sensibilisiert, müssten als Ausdruck einer Second-set-Reaktion die Transplantate beschleunigt abgestoßen werden. Das Fehlen einer Sensibilisierung findet ausreichend Erklärung in der oben beschriebenen, intensiv immunsuppressiven Wirkung der ALS-Therapie.

Zum Zeitpunkt der Parabiosierung sind beide Parabionten weitgehend entleert von thymusabhängigen Lymphozyten (116,221) und so zu einer zellulären Immunreaktion mit Ausbildung von "Memory-Zellen" nicht in der Lage.

In engem Zusammenhang mit dem Ausbleiben einer Sensibilisierung, steht die Beobachtung, daß ALS-vorbehandelte Parabionten in keinem Fall die klinischen Zeichen der bei unbehandelten allogenen Parabionten auftretenden Parabiosekrankheit (Sekundärkrankheit) zeigten (40,91,148). Da die zusätzliche Thymektomie (Versuch II) die Resultate (von Exp. III/1) nicht wesentlich veränderte, ist die Verhinderung der Sekundärkrankheit oder Parabioseintoxikation allein der Wirkung von ALS zuzuschreiben. Unter Berücksichtigung des bereits erwähnten Befundes, daß alle Parabionten in den ersten 8 Wochen nach Trennung ihre immunologische Reaktionsfähigkeit wiedererlangten und unter Annahme, daß sich zwischen den Parabionten eine funktionsfähige Kreuzzirkulation ausbildete, könnte die Verhinderung der Parabiosekrankheit auf folgende (vorübergehende) Vorgänge zurückgeführt werden:

a) Nach Behandlung mit ALS fehlen beiden Parabionten die für die Initiierung einer GvH-R erforderlichen, immunkompetenten, thymusabhängigen Zellen (7,193). Die Unfähigkeit eine GvH-R auszulösen, korreliert mit der Dauer der Immunsuppression, die wiederum von der Potenz und Aktivitätsdauer des verabreichten ALS abhängt (94). In diesem Fall entspricht die Vorbehandlung der Parabionten, die über die Kreuzzirkulation zu Zellspendern werden bis zu einem gewissen Grad der Vorbehandlung von Knochenmarkspendern mit ALS vor Entnahme des Knochenmarks (105) oder einer in vitro Incubation des Zelltransplantats mit ALS (ALG vor Transplantation (70,145,175,220). Dabei inaktiviert ALS die im Transplantat enthaltenen,differenzierten Lymphoidzellen (T-Zellen) und verhindert dadurch in vielen Fällen das Auftreten einer akuten GvH-R.

Da in Experiment III beide Parabionten ALS erhielten, kommt die Situation bei Parabiosierung einer Empfänger-Spender-Vorbehandlung gleich. Van Bekkum (27,28) zeigte in Experimenten mit Mäusen und Affen, daß auch die E m p f ä n g e r vorbehandlung mit ALS zu einer Abschwächung der nach Transplantation incompatibler Knochenmarkzellen aufgetretenen, akuten GvH-R führt. Vermutlich bleibt selbst nach Beendigung der ALS-Therapie eine Immunsuppressive Restaktivität (6-9 Tage) im Empfänger wirksam, die sich nicht nur auf nachreifende, eigene (Empfänger-) Lymphozyten, sondern auch auf immunkompetente Spenderlymphozyten erstreckt (94,95). Allen und Gengozian (3), die ATG-vorbehandelten Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung syngenes Knochenmark oder Milzzellen transplantierten, konnten eine Restaktivität im Serum der Empfänger auch nach Absetzen der Therapie bestätigen. Sie fanden, daß die immunologische Funktion transplantierter Zellen durch noch im Serum der Empfänger vorhandenes ATG verändert werden kann, ohne daß dieses ATG zytotoxisch sein muß. Als einen weiteren möglichen Effekt der ALS-Empfängervorbehandlung auf nachfolgend transplantierte Zellen stellen sie durch ATG verursachte temporäre Veränderungen im Mikroenvironment von Milz und anderen hämopoietischen Geweben zur Diskussion, Veränderungen, die zusammen mit ATG-Antikörpern ein adäquates "homing" (102) und adäquate Differenzierung verhindern. Deshalb wandern Thymuszellen nach vorheriger Inkubation mit ALS, selbst wenn dieses hoch verdünnt (1:1000) ist in erhöhtem Maße in die Leber anstatt in Milz und Lymphknoten, wenn sie nach Inkubation Mäusen injiziert werden (117). Gowans (76) zeigte in autoradiographischen Untersuchungen über das Schicksal GvH-R-auslösender Zellen im Empfänger daß Parental-Lymphozyten nach Injektion in semiallogene F1-Hybride vornehmlich in die periarteriolären Felder der Empfängermilzen wandern, die später als die thymusabhängigen Regionen identifiziert wurden (88). Ein Teil dieser Zellen verbleibt in dem Gewebe und differenziert in große pyroninophile Zellen, die sich teilen und immunologisch aktiv werden. Atkins und Ford (8,66) bestätigten die Ergebnisse Gowans' und machten in ihrer Studie über die frühen zellulären Vorgänge bei einer systemischen GvH-R auch quantitative Angaben. Danach wandern ungefähr 61% der injizierten Parental-Lymphzellen (gewonnen aus dem ductus thoracicus) in die thymusabhängigen Zonen der Milz und 33% in die der Lymphknoten des F1-Empfängers. N u r 4,5 bis 12% der (T-)Zellen erkennen die fremden Empfängerantigene und etwas weniger sind zur immunologischen Reaktion fähig.

Die ALS-Behandlung der Parabionten vor Parabiosierung verhindert das Auftreten einer GvH-R oder Parabiosekrankheit in dem einen oder anderen

Partner durch die intensive Inaktivierung oder Reduktion der ohnehin relativ wenigen, in einer GvH-R immunologisch a k t i v e n Lymphozyten (8,66). Etwaige zum Zeitpunkt der Parabiosierung noch existierende immunkompetente Lymphozyten oder innerhalb der ersten Tage nach Beendigung der ALS-Therapie nachreifende Lymphozyten fallen nach Eintritt ins periphere Blut des Parabiosesystems einer ALS-Restaktivität zum Opfer (3,94,95) und erreichen nicht das lymphatische Gewebe des Partners zur Auslösung einer GvH-R.

b) ALS zerstört oder maskiert die Gewebsantigene der Lymphozyten beider Parabionten vor Parabiosierung und beseitigt damit zunächst den Stimulus für eine Proliferation und Reaktion noch existierender Lymphozyten (33,125). D.h., das Parabiosesystem ist nach ALS-Behandlung beider Partner nahezu völlig frei von Histocompatibilitätsantigene tragenden Lymphoidzellen oder die wenigen verbleibenden Antigene sind maskiert, so daß eine Stimulation zur Proliferation und Reaktion noch vorhandener, allogener, immunkompetenter Zellen nicht erfolgen kann. Die Bedeutung von Empfängerlymphozyten für die Auslösung einer GvH-R wurde mehrfach nachgewiesen (33,53,54,55).

c) E n h a n c e m e n t - Normale, mit ALS-behandelte Mäuse erlangen ihre Immunkompetenz nach einem Zeitraum wieder, der im wesentlichen von der Aktivität des verwendeten Pools bestimmt wird (94). In Experiment II/1 wurde gezeigt, daß CBA-Mäuse nach 9-tägiger ALS-Therapie die Fähigkeit zur zellulären Immunreaktion zwischen dem 29. und 36. Tag nach Therapieende wiederentwickeln. CBL-Mäuse dagegen werden bereits 2 bis 4 Wochen nach ALS-Gabe immunkompetent. Die Wiedererlangung der Kompetenz korreliert mit dem Wiederauftreten eines normalen Lymphozytenmusters (185). D.h., daß für den nicht thymektomierten CBL-Parabionten - und das P.-System - die langsam einsetzende Wiederbesiedlung des lymphatischen Gewebes mit Lymphozyten mit der 3. Woche der Parabiose zusammen fällt. Vorausgesetzt, daß in dieser Phase das Parabiosesystem keine ALS-Restaktivitäten mehr beeinflussen und daß die Parabiose diesen Prozeß nicht verzögert, während zirkulierende CBL-Lymphozyten in der Lage in sich langsamer regenerierenden CBA-Partner eine GvH-R auszulösen. In dieser Parabiosephase ist als Grund für die Verhinderung einer GvH-R neben der mangelnden Stimulation immunkompetenter Lymphozyten (s. Punkt b) und der früher zitierten, temporären "Verbrauchsparalyse" (bei der sich neu heranreifende Lymphozyten in einer Art Verbrauchreaktion möglicherweise schon während des Differenzierungsprozesses gegenseitig stimulieren und ohne einen Gewebsschaden anzurichten zu Grunde gehen) ein Enhancementmechanismus denkbar. Ein Enhancement könnte auch in den t h y m e k t o m i e r t e n Parabionten wirksam werden, wäre aber für die Verhinderung einer GvH-R von geringerer Bedeutung, da die Immu

suppression nach Thymektomie und ALS-Therapie deutlich über den Parabio sezeitraum hinausreicht (92,140,Exp. II/2).

Der Begriff immunologisches Enhancement wurde ursprünglich auf das e folgreiche Anwachsen und progressive Wachstum eines homologen Tumor- transplantates, vermittelt durch seinen Kontakt mit einem spezifischen Antiserum im Empfänger, angewendet (.8). Dieses Enhancing-Antiserum kann im Empfänger entweder aktiv durch Immunisierung mit Gewebe des Tierstam- mes erzeugt werden, von dem der Testtumor stammt, oder durch passive Immunisierung mit Hetero- oder Isoantiseren. Enhancement wurde später etwas weiter gefaßt und als ein Antikörper abhängiges, immunologisches Phänomen definiert, das die verlängerte oder uneingeschränkte Überleben- zeit eines allogenen (Organ-) Transplantates ermöglicht (99). Der dem Enhancement zu Grunde liegende Mechanismus ist bis heute nicht völlig verstanden (47). Die Unterdrückung der zellulären Immunität kann durch aktives (57,115,237,245) oder passives (5,16,46,47,68,69,84,200) Enhan- cement erreicht und an der Überlebenszeit transplantierter Tumoren (5, 98) und Organe, wie Niere (16,69,237,245), Herz (46,47,84) oder Haut (82,122,200) gemessen werden. Während im Falle passivem Enhancements de Transplantatempfänger ein Isoantiserum unmittelbar vor und/oder nach de Organübertragung erhält, das in einem zum Empfänger isogenen Tier durch Immunisierung mit Organspenderzellen erzeugt wurde (69), besteht das aktive Enhancement in der direkten Immunisierung des Transplantatempfän- gers mit Spenderzellen oder Zellfragmenten vor Transplantation (115,237 245). Erfolg und Intensität des Enhancements hängen von der Potenz des verwendeten Serums, dem Differenzgrad der genetisch determinierten Hist- compatibilität zwischen Organempfänger und-Spender und von einem adä- quaten "timing" von Serum bzw. Antigengabe und Transplantation ab (57, 98,184). Das Serum muß kurz vor oder nach dem Antigen, einen (184) oder 7 bis 14 Tage (245) vor Organtransplantation injiziert werden. Enhance- ment verhindert die Transplantatabstoßung durch spezifische Unterdrük- kung der zellulären Immunreaktion des Transplantatempfängers (139) ohne offensichtlich den Immun s t a t u s zu verändern (69,84,115). Lymph- knoten-und Milzzellen von Tieren, die ein "enhanced" Transplantat trage sind zu einer zellulären Immunreaktion gegenüber Spendergewebsantigenen fähig (68). In vitro Tests (CMI und MLC) mit diesen Lymphozyten deuten darauf hin, daß passives Enhancement die Immunisierung von "Teilen des zentralen Immunsystems des Empfängers" durch das Transplantat verhinder (84). Zweifellos produzieren jedoch Träger von "enhanced transplants" zytotoxische Antikörper gegen die Transplantatgewebsantigene (69,184). Das Enhancement-Phänomen ist an die kontinuierliche Gegenwart des Trans

plantates (der Antigene) gebunden, denn es verschwindet nach dessen Entfernung (184). Ein Zweittransplantat vom selben Spenderstamm wird nicht toleriert. Die Aktivität aktiven oder passiven Enhancements ist auf Serumantikörper zurückzuführen, die gegen den Hauptgewebsantigenkomplex des Spenders gerichtet, bestimmte Antigene des Transplantates entweder maskieren und so eine HvG-R verhindern (peripherer, afferenter Block) oder den Erkennungsmechanismus auf Seiten der Empfängerzellen blockiere (peripherer, efferenter Block) oder über einen undefinierten,"zentralen Block die zelluläre Immunreaktion im Empfänger spezifisch unterdrücken (5,46,47,69,84,200). Dabei ist auffallend, daß für einen Enhancing-Effekt meist nur sehr geringe Mengen von Antikörpern notwendig sind (14, 225). Ohne auf den einen oder anderen Enhancement-Mechanismus einzugehen könnte man ganz unspezifisch sagen, daß Enhancement den immunologischen Prozeß, der normalerweise im Empfänger durch Konfrontation mit fremden Gewebsantigenen in Gang gesetzt wird und zu deren Abstoßung führt, zu Gunsten des Transplantates verändert. Den meisten Beobachtungen scheint gemeinsam zu sein, daß der Verhinderung der frühen Empfängersensibilierung auf T-Zellebene eine ganz wesentliche Bedeutung zukommt. In Übereinstimmung damit stünde der von Batchelor et al. (16) beobachtete potenzierende Effekt von ALS auf das Transplantat-Enhancement. Danach führt die zur passiven Enhancement-Therapie zusätzliche Gabe von ALS an 2 Tagen nach Organtransplantation (Tag + 2, +5) zu signifikant verminderten Abstoßungsreaktionen (1/5) im Vergleich zu Alloantiserum allein (5/5) oder zu ALS-behandelten Kontrollgruppen (5/5). Voisin und Kinsky (225) beschrieben erstmals die Anwendung von Enhancing-Serum im Zusammenhang mit der Transplantation immunkompetenter Zellen. Während ca.64% A-Mäuse in den ersten 5 Wochen nach neonataler Injektion von 7 mal 10^6 Milzzellen erwachsener CBA-Spender an der Runt-disease (GvH-R) starben, erlagen im gleichen Zeitraum nur 23 bis 41% entsprechend transplantierter Mäuse dem Runting, wenn ihnen zusätzlich (gleichzeitig und später wiederholt) mit den Zellen CBA-anti-A-Enhancement-Serum injiziert wurde Die überlebenden Tiere erwiesen sich außerdem in höherem Maße tolerant gegenüber den Spendergewebsantigenen als die A-Mäuse, die unmittelbar nach der Geburt n u r CBA-Zellen erhalten hatten. Einen auf die GvH-R mildernden Effekt eines gegen den Empfänger (A x C57BL) F1 bzw. dessen A-Komponente gerichteten Isoantiserums, gegeben 2 Stunden vor und 1 bis 4 Tage nach Injektion von CBL-Milzzellen konnten Batchelor und Howard (15) in einigen Fällen erzielen. Im System CBL-Spender, (CBAxC57BL) F1-Empfänger hatte die vorherige Antikörperinjektion jedoch einen potenzierenden Effekt auf die entstehende GvH-R.

Die Befunde Batchelors wurden später von Voisin et al. (226) an ver-

schiedenen Empfänger-Spender-Kombinationen bestätigt und die Spezifität des Enhancing-Phänomens aufgezeigt. Sie versuchten nicht nur durch passives Enhancement, sondern auch durch aktives Enhancement das Auftreten der Sekundärkrankheit in F1-Hybriden nach Parental-Milzzellinjektion zu verhindern indem sie die prospektiven Spender (Parental-Mäuse) mit Empfängerzellen bzw. Zellfragmenten immunisierten. Interessanterweise stellte sich nur dann ein Sekundärkrankheit verhindernder Enhancing-Effekt ein, wenn die Spender 5 Tage vor Transplantation mit lyophilisierten Empfängerzellen immunisiert worden waren. Die Spender-immunisierung mit bestrahlten oder normalen Empfängerzellen (zum gleichen ode verschiedenen Zeitpunkten) führte dagegen zu einer Verschlimmerung der Krankheit dar F-1 -Empfänger (vermutlich durch Sensibilisierung des Parentaltieres gegen die Empfängerantigene). Aktives Enhancing von Nierentransplantaten konnten dagegen Fabre und Morris (59) in Ratten dadurch erzielen, daß sie Empfängertieren (parental) am 7. Tage oder noch früher vor Transplantation geringe Mengen normales Blut vom Transplantatspenderstamm injizierten. Nach Untersuchungen von Jose et al.(96) liegt die GvH-R verhindernde Aktivität von Enhancementsera speziell in den IgG 2a und IgG 3 Immunglobulin G Unterklassen. IgM zeigte dagegen einen die Reaktion geringgradig verstärkenden Effekt.

Selbst die passive Immunisierung von Parentaltieren, die später als Milzzellspender für neugeborene F1-Empfänger dienten, mit gegen Empfängerantigen gerichteten Isoantiserum verhindert erfolgreich die normaler weise auftretende GvH-R (186). Dieses wie auch alle anderen zitierten Experimente beschreibt jedoch nur das Phänomen "Enhancement" unter verschiedenen Aspekten ohne eine Antwort auf die Frage nach dem eigentlichen Mechanismus zu geben.

Ein Enhancement als GvH-R unterdrückender Faktor in der späten Parabiose ist nur auf der Basis aktiver Immunisierung denkbar. Die ALS-Behandlung der Partner vor Parabiosierung könnte die für die Entwicklung aktiven Enhancements notwendigen Bedingungen gewähren. Durch weitgehende Inaktivierung bzw. Beseitigung immunkompetenter Lymphozyten, vor allem T-Zellen (93,116) wird die zelluläre Immunität unspezifisch unterdrückt, weder Abstoßungsreaktion noch Sensibilisierung durch Partnerantigene sind möglich. Gleichzeitig wird die Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern gegen Partner-(Gewebs)-Antigene durch die ALS-Behandlung nicht in gleichem Maße eingeschränkt wie die Fähigkeit zur zellulären Immunreaktion. B-Zellen,weniger betroffen von der ALS-Wirkung, bilden bei relativ hohem Antigenüberschuß auch ohne die Kooperation oder unter Kooperation mit nur wenigen T-Zellen, die selbst keine GvH-R verursachen, geringe Mengen Anti-H2-Antikörper. Bereits wenige AK könnten einen Enhancing-Effekt gewähren und Stimulation und Reaktion nachreifender T-Zellen unterdrücken. Mit anderen Worten: ALS erlaubt die Bildung

von Enhancing-Antikörpern bevor eine zelluläre Immunreaktion wirksam wird.

Experimentell erzeugte "B-Tiere" (Tiere, die in Folge Thymektomie, Bestrahlung und Knochenmarktransplantation, sowie durch ductus thoracicus Drainage weitgehend frei von T-Zellen sind) sind in ihrer zelluläre Immunität zwar deutlich beeinträchtigt, wie GvH-R-Essay und verlängerte Hauttransplantatüberlebenszeiten zeigen, produzieren aber dennoch geringe Mengen Alloantikörper gegen Gewebsantigene des Transplantatspenders (181,182). "Nude" Mäuse, die trotz congenitaler Thymusaplasie über einige thetapositive Zellen verfügen (171), deren immunologische Kompetenz jedoch nicht eindeutig nachgewiesen ist, stoßen zwar allogene Hauttransplantate nicht ab, bilden aber,wenn auch vermindert,Antikörper gegen Schaferythrozyten (241), eine Reaktion,die eigentlich die Anwesenheit und Aktivität von T- und B-Zellen erfordert (135). Bei den ALS-behandelten Parabionten handelt es sich zwar nur um "relative" B-Tiere, ihre immunologische Reaktionsweise könnte jedoch B-Tieren und "nude" Mäusen weitgehend entsprechen. Allerdings konnten Monaco und Franco (143) erst dann Anti-H2-Antikörper in ALS-behandelten Hauttransplantatempfängern bestimmen, wenn eine Transplantatabstoßung bereits eingesetzt hatte. Ihr Testsystem war jedoch möglicherweise nicht sensitiv genug, denn Lance und Batchelor (in 143 zitiert) fanden in ALS-behandelten Transplantat tragenden Mäusen hohe Titer zytotoxischer Antikörper. Bereits ganz geringe Mengen Antikörper, die nur mit sehr empfindlichen Tests nachgewiesen werden können, vermitteln einen Enhancing-Effekt.

d) Nach Ramseier (174) tragen T-Zellen auf ihrer Oberfläche hochspezifische Erkennungsstrukturen (RS), die speziell der Erkennung von Transplantationsantigenen dienen. Ramseier und Lindemann (172) zeigten in MLC-Tests, daß die Erkennung von Transplantationsantigenen durch Antikörper, die gegen diese R-Strukturen gerichtet sind, blockiert wird. Mit hochspezifischen, homologen Antiseren konnten sie selektiv A-R-Strukturen auf B-Zellen, nicht aber deren C-R-Strukturen blockieren.

Möglicherweise sind die Voraussetzungen für die Bildung derartiger Anti-R-Strukturen-Antikörper in den ALS-behandelten Parabiosen günstig. Die Anti-RS-Antikörperproduktion könnte während der ALS bedingten Unterdrückung der zellulären Immunität mit dem Wiederauftreten solcher Strukturen tragender Lymphozyten einsetzen,in dem Sinne, daß immunkompetente (B-)Zellen des CBL-Partners Anti-CBL-RS-Antikörper gegen die Erkennungsstrukturen für CBL-Transplantationsantigene auf CBA-Lymphozyten bilden (und umgekehrt). Die schrittweise Blockierung der Erkennungsstrukturen auf den allogenen - nach ALS-Therapie - wieder nachreifenden Partnerlymphozyten verhindert eine normale, zelluläre Immunreaktion und damit die Entstehung einer Parabiosekrankheit. Auch die Blockade solcher Er-

kennungsstrukturen erfordert ähnlich dem Enhancement nur ganz geringe Antikörpermengen (174).

Welchem der unter a) bis d) genannten Prozesse die entscheidende Bedeutung zukommt, läßt sich ohne weiter-gehende Untersuchung nicht bestimmen. Da die Parabionten ihre Immunkompetenz nach der Trennung uneingeschränkt wiedererlangen, müssen jedoch die aktiven Vorgänge c) und d) mit der Trennung oder in den ersten Wochen nach Trennung ein Ende gefunden haben, wahrscheinlich infolge mangelnder bzw. sich stetig vermindernder Antigenpräsenz bei gleichzeitig fortschreitender Regeneration des Immunapparates.

Die folgenden Experimente befassen sich deshalb mit der Frage, ob sich mit Hilfe der Parabiose nach einer Modifizierung der Versuchsanordnung eine d a u e r h a f t e Veränderung der zellulären Immunität erreichen läßt. Versuch IV zeigt zunächst die verstärkte Immunsuppression nach modifizierter ALS-Gabe. Wird das Serum in zwei jeweils 6 Tage dauernden Perioden, zwischen denen ein therapiefreies Intervall von 14 Tagen liegt, injiziert, erhöht sich die Überlebenszeit allogener Transplantate gegenüber der Hauttransplantatüberlebenszeit nach einmaliger, 9 Tage dauernder ALS-Therapie. Daß es sich auch hier um eine unspezifische Unterdrückung der zellulären Immunität handelt, läßt sich aus dem Verhalten der Empfängertiere gegenüber Zweittransplantaten ersehen. Bei 8 von 10 thymektomierten CBA-Mäusen bewirkt zweifache ALS-Gabe immerhin eine anhaltende, d.h. mehr als 150 Tage dauernde Unfähigkeit zur Immunreaktion. Eine genaue Untersuchung über die Ursache der größeren Effektivität der "ALS-Intervall-Behandlung" liegt nicht vor, doch ließe sie sich wie folgt erklären:

a) Die 2. ALS-Therapie-Phase, 14 Tage nach der ersten fällt in ein sehr frühes Stadium der Erholung von den Folgen der 1. Therapiephase, das ja m o r p h o l o g i s c h bei nicht thymektomierten Tieren in der 2. bis 3. Woche, bei thymektomierten in der 4. bis 6. Woche nach Therapieende erkennbar wird (43,79,140,185). Dadurch erstreckt sich die Serumwirkung auf eine neue, proliferierende und sich differenzierende Lymphzellgeneration. Nachgereifte oder -reifende Lymphoidzellen, die sich zu Beginn der 2. Therapiephase "auf dem Weg" in das entleerte lymphatische Gewebe befinden, um es zu repopularisieren, werden durch das ALS inaktiviert (211).

b) Die 1. Phase der ALS-Therapie ruft bei einer Verminderung hämopoietischer Stammzellen im Knochenmark deren Zunahme in der Milz hervor (103,106,176). Wenngleich nach Denman und Frenkel (49) nur geringe Mengen Antiserum in Milz und Lymphgewebe eindringen, sind bei der Zweitbehandlung mehr Stamm- und sich differenzierende, noch unreife Vorläuferzellen der ALS-Wirkung ausgesetzt. Der Grad der immunologischen "Un-

reife" wird dadurch verstärkt bzw. der Prozeß der Wiedergewinnung der immunologischen Kompetenz verzögert.

Das modifizierte ALS-Therapieschema wurde für die folgenden Parabioseversuche gewählt, um:

1. eine wechselseitige Transplantation hämopoietischer Zellen zu ermöglichen, wozu eine 9-tägige (einfache) ALS-Therapie offensichtlich nicht ausreichte.

2. in beiden Partnern während der Phase der Antigenkonfrontation (Zellaustausch durch Kreuzzirkulation) einen Zustand maximaler "immunologischer Unreife" zu erzeugen.

ad 1. Eine erfolgreiche Transplantation durch Kreuzzirkulation erfordert die Erfüllung dreier wichtiger Voraussetzungen:

a) im peripheren Blut müssen in ausreichender Zahl hämopoietische Zellen zirkulieren - auch nach einer intensiven ALS-Behandlung.

Barnes und Louitit (13) wiesen mit Hilfe der CFU-Technik nach, daß im Blut normaler CBA/H-Mäuse pluripotente Stammzellen zirkulieren (etwa 10/ml). Ihre Zahl erhöht sich nach Antigenstimulation sowie in der Erholungsphase nach subletaler Bestrahlung. Goodman und Hodgson (75) hatten bereits früher gezeigt, daß die Injektion von Leukozytenkonzentraten, die aus peripherem Blut von F1-Tieren gewonnen worden waren, supraletal bestrahlte Parentalmäuse vor dem Strahlentod bewahrte und zu F1-in-P-Chimären führte, d.h., daß die Konzentrate Stammzellen enthielten. Daß zahlreiche exogene Faktoren die Zahl der zirkulierenden Stammzellen erheblich verändern können, geht aus den Untersuchungen von Vos et al. (229) hervor. Interessant war ihre Beobachtung, daß die Zunahme pluripotenter Stammzellen (CFU's) in der Milz (nach Endotoxininjektion) von einer deutlichen Zunahme der Stammzellen auch im Blut begleitet wurde.

Welche Bedeutung der Existenz und Zirkulation hämopoietischer Zellen im Blut mit Hinsicht auf die Parabiose zukommt, geht aus Experimenten von Tyler und Everett (223) hervor: Das Knochenmark letal bestrahlter Ratten wird von Zellen syngener, teilkörperbestrahlter (die hinteren Extremitäten waren vor Bestrahlung geschützt worden) Parabionten wieder besiedelt. Ihren autoradiographischen Studien nach entstammten diese Zellen dem strahlengeschützten Knochenmark des teilkörperbestrahlten Partners. Mit Hilfe der Chromosomenmarkertechnik (an CBA- und CBA/T66-Mäusen) zeigten Thierfelder et al. (214), daß die in Knochenmark und Milz eines letal bestrahlten Parabionten gefundenen Zellen zu mehr als 90% aus dem unbehandleten (syngenen) Partner stammen, der somit als "Zellspender" fungiert. Besonders wichtig war jedoch ihre Beobachtung,

daß eine ALS-Behandlung beider Parabionten (6 Tage 0,25 ml tgl., am Tag nach Bestrahlung beginnend) die Ausbildung der Empfänger- Spendersituation mit Stammzelltransplantation vom nichtbestrahlten auf den bestrahlten Parabionten nicht negativ beeinflußte. Im Gegenteil, ALS beschleunigte ganz offensichtlich Transplantation und Repopularisierung von Knochenmark und Milz - vermutlich durch eine ALS-induzierte, vermehrte "Ausschüttung"von Stammzellen in die Peripherie. Bei weiteren Untersuchungen konnten analoge Beobachtungen auch an allogenen Parabiosen gemacht werden. Die von DeMeester et al. (124) und Ledney (106) beschriebene Stammzelltoxizität von ALS - Reduktion hämopoietischer Zellen in Knochenmark und peripherem Blut - steht der Transplantationspotenz durch Kreuzzirkulation demnach nicht entgegen.

b) das erfolgreiche Anwachsen allogener (blutbildender) Zellen erfordert eine ausreichende Immunsuppression des Empfängers (s. auch Einleitung), die hier vom ALS in modifizierter Anwendungsform geleistet werden sollte.

c) alle bisherigen Versuche hämopoietische Zellen zu transplantieren lassen vermuten, daß eine dauerhafte Ansiedlung und Proliferation der übertragenen Zellen im Empfänger "Raum" erfordern. Ob ALS in dem hier angewandten Therapieschema den erforderlichen Raum zu "schaffen" vermag kann nicht mit Sicherheit bejaht werden. Wie die Chromosomenanalyse bei syngenen Parabionten nach identischer Vorbehandlung (Exp. IX/1) zeigt, bewegt sich der Anteil an Partnerzellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark am 21. Tag nach Parabiosierung zwischen 1% und 6%.

Während Experimente die Effektivität von ALS als Immunsuppressivum für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation belegen - zusätzliche Bestrahlung oder Chemotherapie erzeugten dabei den nötigen "Raum" (17, 222) - fehlen für seine "raumschaffende" Wirkungskomponente eindeutige Beweise. Die Konditionierung von Knochenmarkempfängern, die an aplastischer Anämie oder an Leukämie litten, mit ALS allein ließ zwar in einigen Fällen ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantates zu, zeigte sich jedoch im weiteren Verlauf, daß die Transplantate entweder nur partiell waren oder die Patienten das Transplantat wieder verloren (78,120). Rogentine et al. (179) berichten von einer Reversion nach erfolgreicher Knochenmarktransplantation im Falle einer aplastischen Anämie, bei der der Patient vor Transplantation nur ALS erhalten hatte.

ad 2. In zahlreichen Untersuchungen wurde deutlich, daß die Immunkompetenz des Empfängers der Hauptfaktor bei der Induktion einer spezifischen Unfähigkeit zur Immunantwort ist. Gewöhnlich ist es um so schwieriger ein Stadium spezifischer "Nichtreaktion" herbeizuführen, je ausgeprägter der immunologische Kompetenzgrad ist. Eine Reaktionsunfähigkeit läßt sich deshalb leichter in immunologisch "unreifen" als in rei-

fen Tieren erzielen (232). Die Ijektion allogener Gewebsantigene in embryonale oder neonatale (d.h. innerhalb 24 Stunden nach Geburt) Tiere induziert bei diesen Empfängern häufig eine anhaltende spezifische Toleranz gegenüber dem allogenen Spendergewebe (30,31). Wenngleich über den Mechanismus dieser "erworbenen Toleranz" (30) auch heute noch keine schlüssigen Ergebnisse vorliegen, scheint eine Langzeittoleranz, die durch neonatale Injektion lymphohämopietischer Zellen (Milz) erzeugt wird einen geringgradigen Chimarismus zu erfordern, zumindest in den ersten Wochen nach Zellinoculation (149). Nur lebende, proliferationsfähige Zellen (86), die der erythropoietischen, myeloischen oder lymphatischen Reihe angehören, können offensichtlich eine dauerhafte Transplantationstoleranz induzieren. Der "Raum" spielt bei diesen Vorgängen offenbar keine wesentliche Rolle.

Nach Einschränkung ihrer Immunkompetenz durch Bestrahlung, chemische Immunsuppressiva oder ALS u n d anschließende A n t i g e n i n j e k t i o n sind auch e r w a c h s e n e Tiere sehr oft über einen verlängerten Zeitraum hinaus bzw. permanent zu einer Immunreaktion gegen dasselbe Antigen nicht in der Lage (232). Medawar (123) zeigte, daß die kombinierte Anwendung von Bestrahlung (subletal) bzw. Methotrexat und Antigen (in Form eines zellfreien "semisoluble" Extrakt lymphatischen Gewebes: Milz, Thymus, Lymphknoten)"synergistisch" wirken. D.h., daß die Abstoßungsreaktion gegenüber Fremdhauttransplantaten nach Kombinationsbehandlung signifikant später erfolgte als nach einfacher immunsuppressiver Therapie, auffallender im H2-compatiblen als-incompatiblen System. Das Stadium der "Reaktionslosigkeit" war in der stark unverträglichen Empfänger-Spender-Kombination begrenzt, ein Chimarismus konnte auf Grund der Methode nicht entstehen.

Es gelang Monaco et al. (142) bei Ajax-Mäusen eine dauerhafte, spezifische Toleranz gegenüber H2-cmpatiblen C3H/He-Gewebsantigenen zu induzieren, indem sie den thymektomierten, ALS-behandelten Parentaltieren (Ajax) vor der Transplantation von C3H/He-Haut 300 x 10^6 Milz und Lymphknotenzellen eines (Ajax x C3H/He) F1-Spenders intravenös injizierten. Mit einem indirekten Test, der allerdings keine Aussage über Vollständigkeit und Grad eines Chimarismus zuläßt, wiesen sie nach, daß die Milzen der toleranten Empfängertiere noch 100 Tage nach Zellinjektion Spenderzellen enthielten. Erfolgreich war die "Toleranzinduktion" nur dann, wenn die Immunsuppression vor spezifischer Antigengabe in Thymektomie und ALS-Therapie bestand. Die Autoren gingen davon aus, daß der Zustand der immunologischen Inkompetenz nach Thymektomie und ALS-Gabe mit ihrem Lymphzellmangel dem Zustand des sich während der Neonatalperiode entwickelnden Immunsystems ähnlich ist (142,144). Das immunologische Ver-

halten der toleranten Parentaltiere hatte Merkmale der klassischen "aktiv erworbenen, immunologischen Toleranz"(nach Billingham, 30), die durch neonatale Lymphoidzellinjektion erzeugt worden war.

Die Injektion H2-differenter Transplantationsantigene in Form eines relativ unlöslichen und stark immunogenen Milzzellhomogenisats erwies sich für eine gezielte Toleranzinduktion in thymektomierten und ALS-behandelten Empfängern als ineffektiv (1).

In ihren weiteren Untersuchungen über Möglichkeiten der Toleranzinduktion - Toleranz hier noch verstanden als spezifische Verlängerung der Überlebenszeit allogener Hauttransplantate bei ALS- und zellbehandelten Tieren über die Überlebenszeit entsprechender Transplantate bei nur ALS-behandelten Empfängern hinaus - machten Wood et al. (238) folgende Beobachtungen:

a) Im allogenen, homozygoten, nicht hybriden System war die Injektion lymphoider Zellen des Hauttransplantatspenders in ALS-behandelte Mäuse, die vorher t h y m e k t o m i e r t worden waren ein unbrauchbares Mittel zur Induktion einer dauerhaften Toleranz, da sich nach Injektion der Zellen eine schwere GvH-R im Empfänger ausbildete.

b) Im selben System hatte die Injektion von K n o c h e n m a r k z e l l e n in nicht thymektomierte, ALS-behandelte Empfänger einen tolerogenen Effekt, der deutlich über dem von Milz- Lymphknoten- oder Thymuszellen lag.

c) Die Zellinjektion zeigte nur dann diesen Effekt, wenn sie nach Immunsuppression mit ALS erfolgte.

d) Der Erfolg einer Toleranzinduktion durch Zellinjektion in ALS-behandelte Empfänger war abhängig von der Zelldosis.

Die spezifisch tolerogene Wirkung der Zellinjektion auf die Immunität ALS-behandelter Tiere ließ sich dadurch verbessern, daß das Zellinoculum (Knochenmarkzellen) vor Injektion in vitro mit ALS inkubiert wurde (77). Empfängertiere, die noch am 200. Tag nach Transplantation Spenderhaut trugen (zwischen 20% und 40%), waren im Gegensatz zu Tieren, in denen durch Thymektomie, ALS und Injektion von F1-Zellen (142) eine "Toleranz" erzeugt worden war, nie Chimären und zeigten nicht die Merkmale der aktiv erworbenen Toleranz.

Theoretisch liefert die "Kombination" von Thymektomie, ALS-Therapie und Parabiose (Exp. V) geeignete Voraussetzungen für eine spezifische Toleranzinduktion im Sinne einer "aktiv erworbenen Toleranz" - auch im allogenen, homozygoten Empfänger-Spender-System:

a) Thymektomie und ALS-Behandlung beider Partner gewährleisten durch intensive Immunsuppression ein Stadium "immunologischer Unreife".

b) Die Parabiose ermöglicht im Gegensatz zur einmaligen Zellinjektion durch die Kreuzzirkulation eine a n h a l t e n d e Antigenkon-

frontation in Form proliferationsfähiger - auch hämopoietischer - Zellen und einen Zellaustausch zum Zeitpunkt der intensivsten Immunsuppression und während der beginnenden immunologischen Regenerationsphase.

Der von Gozzo et al. (77) beobachtete positive Effekt einer in vitro Inkubation der Knochenmarkzellen mit ALS auf ihre Toleranz induzierende Potenz könnte auch durch die ALS-Vorbehandlung der Parabionten vermittelt werden.

Die Ergebnisse von Experiment III und V zeigen jedoch eindeutig, daß diese Kombination - einschließlich der verstärkten Immunsuppression durch die wiederholte ALS-Gabe - nicht über eine Verlängerung der u n s p e z i f i s c h e n Immunsuppression hinausführt, eine spezifische Toleranz im klassischen Sinne also nicht induzieren kann. Beide Experimente unterschieden sich in der Intensität der Immunsuppression der Parabionten, beide Versuche entsprachen sich in der jeweils völlig gleichartigen Behandlung b e i d e r Partner. Der identischen Immunsuppression beider Partner vor Parabiosierung durch gleiche Dosen ALS bzw. Thymektomie und ALS folgt - für den Parabiosezeitraum - offensichtlich ein Stadium, das durch ein G l e i c h g e w i c h t immunologischer In- oder Restaktivität zwischen den beiden Parabionten einen aktiven Prozeß im Sinne einer spezifischen Veränderung der Immunität des einen oder anderen Partners n i c h t erlaubt. Wie an den folgenden Versuchen sichtbar wird, ließ sich dieses "immunologische Gleichgewicht" im Parabiosesystem durch Parabiosierung eines n i c h t t h y m e k t o m i e r t e n, ALS-behandelten mit einem t h y m e k t o m i e r t e n, ALS-behandelten Partner beeinflussen. Mit der Teilthymektomie steht dem Parabiosepaar in der wichtigen Phase der immunologischen Regeneration nach Immunsuppression bei gleichzeitiger Antigenpräsenz ein funktionsfähiger Thymus (mit seinem organspezifischen Stroma) zur Verfügung, für den nicht thymektomierten ein autogenes, den thymektomierten Parabionten ein allogenes Organ.

Das Beispiel der Teilthymektomie bei syngenen, ALS-behandelten Partnern (Exp. VI) verdeutlicht die funktionelle Bedeutung des Thymus n o c h w ä h r e n d der Parabiose (Kreuzzirkulation) für die Wiedergewinnung der zellulären Immunität b e i d e r Parabionten. Nach Parabiose mit einem ALS-behandelten (Exp. VI/1) oder unbehandelten (Exp. VI/2), n i c h t thymektomierten Partner gewinnen t h y m e k t o m i e r t e, ALS-behandelte Tiere ihre Immunkompetenz ebenso rasch wie der wie die nicht thymektomierten Partner. Welche Vorgänge sich im Einzelnen in beiden Partnern abspielen, läßt sich an Hand von Experiment VI nicht eindeutig sagen. So mag die Bedeutung des Thymus für das Immunsystem des thymektomierten, ALS-behandelten Parabionten einmal in seiner Funktion als endokrines Organ liegen, dessen Hormon beide Partner

durch Kreuzzirkulation gleichermaßen erreicht. Sie mag zum anderen in seinem spezifischen Gewebe mit besonderer Struktur liegen, in das - während der Parabiose - auch "präthymale" Zellen (s. frühere Diskussion) aus dem hämopoietischen Gewebe des thymektomierten Partners gelangen, um dort durch "Information" oder Differenzierung einen "postthymalen" Reifungsgrad zu erzielen, bevor sie über den Shunt in das durch ALS entleerte lymphatische bzw. lymphohämopoietische Gewebe zurückkehren (208, 209,210). Schließlich kann eine Transplantation immunkompetenter Zellen, die im nicht thymektomierten Partner unter Thymuseinfluß nachreifen, auf den thymektomierten Parabionten dessen Immunkompetenz wiederherstellen.

Während in Experiment VI/1 die Transplantation auf Grund der gleichen ALS-Vorbehandlung der Parabionten für die immunologische Regeneration der thymektomierten Partner wohl kaum eine Rolle spielt, dürfte ihr in Experiment VI/2 eine entscheidende Bedeutung zukommen.

Die interessante Beobachtung in Experiment VI/2, daß die zelluläre Immunreaktion unbehandelter CBL-Tiere nach Parabiose mit thymektomierten, ALS- behandelten CBL-Partnern beeinträchtigt ist, dürfte auf auch noch nach Therapieende persistierende ALS-Restaktivitäten zurückzuführen sein, die nach Parabiosierung und Ausbildung einer Kreuzzirkulation immunsuppressiv auf den unbehandelten Parabionten wirken.

Möglicherweise wird der immunsuppressive Effekt geringer Mengen noch zirkulierenden ALS' auf den unbehandelten Partner durch eine Verminderung immunkompetenter Zellen im unbehandelten Partner infolge "Transplantation" auf den behandelten Partner - eine Art Äquilibrium - zusätzlich verstärkt.

Da sich die experimentellen Bedingungen in Versuch VII und VI/2 völlig gleichen (gleiches Versuchsprotokoll) darf man annehmen, daß im teilthymektomierten, s e m i a l l o g e n e n Parabiosesystem prinzipiell ähnliche morphologische und physiologische Vorgänge möglich sind, wie im teilthymektomierten, syngenen System. Wie Versuch VII zeigt, tra bei 12 von 17 Parentaltieren eine anhaltende, spezifische immunologisch Toleranz gegenüber den Gewebsantigenen des F-1-Partners auf.

Der einzige, wesentliche Unterschied zwischen den Experimenten VII und VI/2, die Parabiosierung zweier histo i n c o m p a t i b l e r Partner (Exp.VII), spiegelt sich in der Ausbildung der Transplantationstoleranz immunologisch wider. Zwar ist diese Toleranz wie die immunologische Reaktion der für CBA-Antigene toleranten CBL-Parabionten gegenüber nicht verwandten, allogenen AKR-Gewebsantigenen veranschaulicht spezifisch, doch könnte die Abstoßungsreaktion auch eine Leistung immunkompetenter F1-Zellen sein, die im unspezifisch reaktionsunfähigen Parentaltier nach Parabiosierung proliferieren, ohne auf Grund der immungenetischen Situation eine GvH-R auslösen zu können. Die kurze Über-

lebenszeit der AKR-Hauttransplantate von weniger als 16 Tagen spricht jedoch dafür, daß die Immunreaktion gegen die Transplantate von immunkompetenten CBL-Zellen ausgelöst wird, denn AKR-Haut (H2k) ist H2-incompatibel für CBL (H2b) und H2-compatibel für CBLxCBA (H2b,2k).

Die Ergebnisse von Experiment VII (semiallogene Parabiosen) und Versuch VIII - in dem das Auftreten spezifischer immunologischer Toleranz bei einigen thymektomierten Partnern nach Parabiose mit homozygot, allogenen, nicht thymektomierten Partnern beobachtet werden konnte, wenn auch in einem geringeren Prozentsatz als im semiallogenen Versuch - deuten bei einem Vergleich mit den Ergebnissen von Experiment III und V darauf hin, daß das Thymusorgan eine wichtige Rolle bei den Vorgängen der spezifischen Toleranzinduktion spielt.

Geht man mit Voisin (228) mit einem vereinfachenden Schema davon aus daß die Immunreaktion (IR) gegen fremdes Gewebe (Zellen) gleich der Summe aus immunologischer Abstoßung (RR=immunreJection) und aus diese Abstoßung verhindernden Reaktionen (FR=facilitation reaction), wie z.B. Enhancement, ist (IR = RR + FR)d.h. IR vom jeweiligen Übergewicht von RR oder FR bestimmt wird, läßt sich ganz allgemein sagen, daß es möglich ist durch T e i l t h y m e k t o m i e , ALS-Therapie und Parabiose im semiallogenen (Exp.VII) und allogenen (Exp.VIII) System die "Gleichung" zu Gunsten der FR zu beeinflussen.

Zwar können die Experimente keinen eindeutigen Aufschluß über die Art der induzierten FR machen, ihre kritische Auswertung rückt jedoch bestimmte Überlegungen über Vorgänge und Mechanismen, die zu der Transplantationtoleranz führen, in den Vordergrund.

Nur in einem Parabionten, der durch Thymektomie und ALS-Therapie maximal immunsupprimiert, d.h. immunologisch "unreif" gemacht wird, läßt sich durch Parabiose mit einem (semi-) allogenen, n i c h t thymektomierten Partner spezifische Toleranz induzieren. Wenn dem Thymus eine entscheidende Rolle bei der aktiven Entwicklung einer Tolernaz zukommt - und die Ergebnisse der Experimente III,V,VII und VIII weisen darauf hin - so kann sie nur in seinem Einfluß auf thymusabhängige Zellen des lymphohämopoietischen Gewebes bestehen (s. Einleitung und Diskussion). Der Thymuseinfluß erreicht seine größte Bedeutung während immunologischer Reifungsphasen. Man kann deshalb annehmen, daß sich für die Ausbildung einer Toleranz entscheidende Vorgänge primär auf Zellebene abspielen, genauer, daß thymusabhängige Zellen an ihnen beteiligt sind, Zellen, die während einer kritischen Phase ~~spezifisch~~ durch den a l l o g e n e n Thymus oder durch Antigenpräsenz und unspezifische Thymuswirkung besonders geprägt werden (altered state of T-cells, 57, oder "suppressor cells", 220).

Etabliert sich die Toleranz während der Parabiosephase, so könnte ihre Aufrechterhaltung nach Trennung durch die A b wesenheit des Thy-

mus (im thymektomierten Partner) gewährleistet sein. Der in der Parabiosephase unter allogenem Thymuseinfluß gleichfalls einsetzende Prozeß der immunologischen Regeneration nach ALS-Therapie wird mit Parabiosetrennung unterbrochen; der in dieser Phase erreichte Immunstatus einschließlich der Toleranz bleibt ohne weitere Thymuspräsenz im wesentlichen unverändert. Untersuchungsergebnisse von Elkins (56) stützen diese Annahme indirekt: Durch neonatale Injektion hämopoietischer Zellen von F1-Spendern in Parentaltiere wurde eine Transplantationstoleranz induziert und später durch Injektion "normaler" Parentalzellen (von einem syngenen Spender) wieder durchbrochen. In einem GvH-R-Test mit Lymphoidzellen des ursprünglich toleranten Tieres 3 bis 4 Wochen später zeigte sich, daß die Reaktion nur von i n o c u l i e r t e n Zellen verursacht wurde, wenn das tolerante Parentaltier vor der Zellinoculation (Aufhebung des Toleranzstatus) t h y m e k t o m i e r t worden war. Blieben die Tiere nicht thymektomiert, waren an der GvH-R auch Zellen des ursprünglich toleranten Parentaltieres beteiligt. Daraus läßt sich entnehmen, daß ein tolerantes Tier nach Durchbrechung der experimentell erzeugten spezifischen Toleranz mit Hilfe normaler Milz- und Lymphknotenzellen seine eigene, uneingeschränkte Immunkompetenz nur in Anwesenheit des Thymus wiedergewinnen kann.

Die Rolle des Thymus speziell im teilthymektomierten, semiallogenen (Exp. VII) und allogenen (Exp. VIII) Parabiosesystem erklärt sich aus unserem Verständnis über seine Bedeutung für die Reifung des Immunapparates. Sie besteht, wie bereits erwähnt,

a) in einer "indirekten" Wirkung, d.h. der eine verbleibende Thymus wirkt durch ein Hormon oder spezifische Substanzen über die gemeinsame Zirkulation auf das lymphohämopoietische Gewebe beider Parabionten.

b) in einer "direkten" Wirkung, d.h. Unreife, immuninkompetente Zellen beider Parabionten unterstehen zeitweise durch vorübergehende Einwanderung in das Organ einem unmittelbaren Thymuseinfluß.

Im semiallogenen und allogenen, teilthymektomierten Parabiosesystem kann der Thymus diese Rolle jedoch nur unter der Voraussetzung erfüllen, daß sich seine Funktion unabhängig von Gewebsantigendifferenzen auf beide, also auch auf den thymektomierten, semiallogenen bzw. allogenen Parabionten erstreckt. Daran scheint, zumindest was seine hormonale Wirkungskomponente anlangt, kein Zweifel zu bestehen. In vivo Versuche zeigten, daß Extrakte aus allogenem und xenogenem Thymusgewebe ebenso effektiv das Abwehrsystem immundefizienter (neonatal thymektomierter) Tiere beeinflussen, wie Extrakte aus syngenem Thymusgewebe (219). Die i.p. Implantation von Milliporekammern, die allogenes Thymusgewebe enthalten führte bei neonatal thymektomierten Mäusen zu einer nahezu gleichartigen immunologischen Restauration, wie die Implantation von

Kammern mit syngenem Thymusgewebe (208). Zellen aus Mäuseknochenmark entwickeln nach Inkubation mit "Thymosin" vom Kalb oder Mensch typische T-Zell-Merkmale (9).

Die Frage in-wie-weit Thymusgewebe auch eine "direkte" Wirkung auf einwandernde allogene Lymphoidzellen ausüben kann, läßt sich nur schwer beantworten, da zum einen seine direkte Wirkung immer von der indirekten (hormonalen) überlagert ist, zum anderen in Transplantationsversuchen, in denen die normalen physiologischen und anatomischen Gegebenheiten gleichzeitig verändert werden, immunologische Aktivitäten auftreten, die als Folge der Gewebsantigendifferenzen zwischen Transplantat und Wirt eine Analyse erschweren. In ihren Untersuchungen über die Thymusfunktion konnten jedoch Stutman et al. (210) zeigen, daß auch semiallogene und allogene Thymusorgane eine, wenn auch im Vergleich zu syngenen Thymi verminderte "direkte" Wirkung auf hämopoietische Zellen ausüben können.

Entsprechen sich direkte und indirekte Thymusfunktion im teilthymektomierten, semiallogenen und allogenen Parabiosesystem prinzipiell, so bedürfen doch die Vorgänge, die in beiden Systemen zur Toleranz führen wegen unterschiedlicher immunologischer Bedingungen einer getrennten Betrachtung:

A. Semiallogene Parabiosen (Exp.VII)

Die Immunsuppression der CBL-Partner durch Thymektomie und zweimalige ALS-Gabe, die die immunologische Reaktionsfähigkeit gegenüber Fremdgewebe für einen Zeitraum von mindestens 36 Tagen ausschaltet (s. Exp. IV), verhindert die sonst bei H2-incompatiblen Einwegparabiosen beobachtete Parabiosekrankheit, die im F1-Partner durch eine Reaktion immunkompetenter Parentallymphozyten verursacht wird (40,97). Mit seinem Effekt auf das hämopoietische Gewebe (103,124,176) könnte ALS auch eine Aktivierung und "Ausschüttung" zahlreicher Stamm- und Vorläuferzellen in die Peripherie (Blut) auslösen. Da eine immunologische Abwehrreaktion von Seiten des F1-Partners nicht stattfindet, können diese Zellen nach Anastomosenbildung frei im System zirkulieren und so auch den F1-Thymus erreichen. Daß die Vorbehandlung des Parentalpartners mit ALS kaum einen Einfluß auf das Zellverteilungsmuster in semiallogenen Parabiosen hat, geht aus Chromosomenanalysen von Nisbet (151,152,153) hervor: Bei seinen Untersuchungen fand er nur sehr wenige F1-Zellen im peripheren Blut der Parentalpartner, keine F1-Zellen im lymphatischen Gewebe des Parentalpartners, jedoch bis zu 16% Parentalzellen in F1-Milzen. Ob und wie weit Thymektomie und die im Vergleich zu Nisbets Versuchen modifizierte ALS-Therapie den Grad des Chimarismus in F1- und Parentalpartner zusätzlich beeinflussen, kann nur mit Hilfe einer entsprechenden Analyse ermittelt werden. Da die F1-Partner nach Trennung keine Anzeichen ei

ner Sekundärkrankheit boten, waren sie entweder nur temporäre Chimären oder wurden von den transplantierten Parentalzellen nicht angegriffen. Besteht ein P in F1-Chimarismus, bieten sich für das Ausbleiben der Pa rabiosekrankheit bzw. ihrer klinischen Symptome und der Toleranz des Pa rentalpartners mehrere Erklärungsmöglichkeiten an:

a) Thymektomie und ALS-Behandlung des Parentalpartners sowie die fol gende Antigenkonfrontation während der Parabiose "beseitigen" selektiv oder inaktivieren irreversibel Lymphzellklone, die potentiell zur Reak tion gegen die tolerierten Gewebsantigene fähig sind (236). Daraus resu tiert eine spezifische Toleranz gegenüber dem (CBL-CBA)-F1-Parabionten, denn dem Parentalpartner fehlt trotz der Möglichkeit der immunologischer Regeneration durch den F1-Thymus der Lymphzellklon, der eine Immunreak tion gegen die CBA-Gewebsantigene auslöst. Natürlich enthalten dann auc Parentalzelltransplantate in F1-Partnern keine potentiell reaktiven Zel len.

Gegen diese Annahme sprechen 2 Punkte: In den allogenen Experimenten III und V führten Immunsuppression (und Thymektomie) beider Partner und Parabiose nie zu einer spezifischen Toleranz obwohl für eine klonale Se lektion die Vorasusetzungen gewährleistet waren. Außerdem läßt sich die offensichtliche Bedeutung des Thymus für eine Toleranzinduktion (Teil thymektomie, Exp. VII, VIII versus Thymektomie beider Parabionten, Exp. III, V) nicht mit der klonalen Selektion in Einklang bringen.

b) Die in ihrer Immunkompetenz kaum beeinträchtigten F1-Partner bil den Antikörper gegen "recognition structures" (RS), die auf parentalen T-Zellen sitzend der Erkennung der CBA-Gewebsantigene dienen (172). Antikörper gegen diese R-Strukturen würden durch deren Blockade verhin dern, daß immunkompetente Parentalzellen den F1-Partner attackieren. Vorausgesetzt, daß noch während der Parabiose T-Lymphozyten ihr volles Reifestadium erreichen, bzw. R-Strukturen ausbilden, könnten alliotypi sche Antikörper (172) gleichzeitig für die Toleranz des Parentalpartner gegenüber F1-Gewebsantigenen verantwortlich sein, wie es Ramseier (173) für die neonatal induzierte Toleranz fordert. Hierbei bildet der F1-Pa rabiont Antikörper gegen R-Strukturen, die sich während immunologischer Reifung (unter semiallogener Thymuswirkung) auf parentalen T-Zellen (174) ausprägen. Die Blockade der für das CBA-Antigen spezifischen Er kennungsstrukturen drückt sich in der Unfähigkeit des Parentalpartners zur immunologischen Reaktion gegen transplantiertes CBA-Gewebe (Haut) aus. Nach Ramseier (173) wird die Toleranz aber nur durch einen F1- in P-Chimarismus aufrechterhalten, wobei die F1-Zellen durch Antikörperbil dung kontinuierlich neu entsehende R-Strukturen (auf nachreifenden Pa rental-T-Zellen) "abdecken". Das vorliegende Parabioseexperiment kann die Frage des Chimarismus nicht beantworten. Ob der hier beobachteten Toleranz ein Mechanismus zu Grunde liegt wie er von Ramseier für die ne

onatal induzierte Toleranz beschrieben wird, kann deshalb nur dann diskutiert werden, wenn deren Aufrechterhaltung nach Trennung der Parabiose auch ohne Chimarismus möglich ist und einmal geblockte immunkompetente Zellen weiterhin geblockt bleiben. In diesem Fall müßten während der Parabiosephase alle auf nachreifenden T-Zellen erscheinenden R-Strukturen durch alliotypische Antikörper neutralisiert werden. Die anfängliche, unter semiallogenem Thymuseinfluß stattfindende immunologische Regeneration des Parentalpartners müßte dann durch die Parabiosetrennung so beeinträchtigt werden, daß neue Zellen mit anti- CBA-Erkennungsstrukturen nicht mehr entstehen können, also auch keine weiteren Antikörper gegen diese Strukturen erforderlich sind. Permanente Toleranz durch alliotypische Antikörper ohne zellulären Chimarismus (F1 in P), nur nach Thymektomie ? Dem stehen die Ergebnisse aus Nisbets Experimenten (152,153) entgegen, der das Auftreten einer spezifischen Toleranz bei n i c h t thymektomierten (ALS-behandelten) Parentalpartnern nach 3-wöchiger Parabiose mit H2-incompatiblen F1-Partnern in Abwesenheit eines zellulären Chimarismus beobachtete.

c) Im F1-Partner proliferierende Parentalzellen produzieren enhancing oder "blocking" Alloantikörper (s.frühere Diskussion), die eine zelluläre Immunreaktion der CBL-Lymphozellen gegen den (CBLxCBA)-Wirt verhindern."Blocking serum factors" wurden von verschiedenen Autoren (10,83 227,242) im Serum erwachsener, durch neonatale Injektion von F1-Milzzellen toleranter F1-in P-Chimären gefunden und für Etablierung und Aufrechterhaltung des Chimarismus sowie der Toleranz verantwortlich gemacht wobei die toleranten Tiere gleichzeitig über Zellen verfügten, die unter bestimmten Bedingungen eine Immunreaktion gegen toleriertes Gewebe bzw Zellen auslösen konnten. Anderen Autoren gelang der Nachweis blockierender Substanzen im Serum toleranter Tiere nicht (36,85).

Rouse und Warner (183) zeigten in einem Versuch mit bursektomierten Hühnern, daß für Induktion und Aufrechterhaltung einer Toleranz gegenüber fremden Gewebsantigenen blockeirende Antikörper nicht obligatorisch sind. Möglicherweise spielen blocking antibodies nur temporär und nicht bei allen Formen der Toleranz (Chimarismus versus Nicht-Chimarismus) eine Rolle und ergänzen bzw. "arbeiten" mit zellulären Vorgängen zusammen (228). So versuchen Wright und Bernstein (29) die immunologische Toleranz (neonatal induziert) auf zwei ineinandergreifende Mechanismen zurückzuführen: Zum einen auf eine Hemmung auf dem Niveau einer Vorläuferzellpopulation, die für die Proliferation und neue Generation zytotoxischer Lymphozyten nötig ist (eine Hemmung als Folge entweder einer völligen Verarmung an oder einer a k t i v e n Suppression von reaktiven Zellen), zum anderen auf eine Inhibition einer Population prospektiver

cytotoxischer Lymphozyten über eine Blockade durch Serumfaktoren. Die relativen Rollen dieser beiden Mechanismen für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber Allotransplantaten könnte möglicherweise als eine Funktion des Grades des erreichten Chimarismus variieren (s. auch 85).

d) Eine thymusabhängige"Hemmung" immunkompetenter bzw. lymphoider Vorläuferzellen vor Erreichen der Immunkompetenz führt zur Toleranz des thymektomierten CBL-Partners gegenüber dem thymustragenden CBLxCBA Partner.

Die Hemmung könnte entweder darin bestehen, daß eine Reifung für CBA-Zellen(-Gewebe) zytotoxischer Lymphozyten selektiv nicht stattfindet, von Lymphozyten, die im CML-Test (= cell mediated lympholysis) erfaßt werden, während alle anderen lymphoiden Zellelemente z.B. MLR-reaktive Lymphozyten aus Stammzellen differenzieren, oder - sofern MLR und CML von ein-und denselben Lymphozyten vermittelt wird - darin, daß Lymphozyten unter semiallogenem Thymuseinfluß zwar reifen, aber selektiv die Fähigkeit zur zytotoxischen Reaktion gegen CBA-Antigene nicht erlangen. Auf diese Möglichkeit weisen Sprent et al. (199) hin, die letal bestrahlte Mäuse mit mit Antithetaserum vorbehandeltem Knochenmark rekonstituierten und anschließend (6 Monate später) die Immunkompetenz der Chimären in MLR-und CML-Tests untersuchten. Sie fanden, daß Lymphozyten dieser Chimären normal gegen die Antigendeterminanten von Drittpartnern reagierten, also immunologisch kompetent waren. Gegen Antigendeterminanten des Empfängers war die Reaktion im MLR-Test etwas verringert, jedoch vorhanden; sie fehlte aber im CML-Test.

Eine andere Form thymusabhängiger "Hemmung" der Immunreaktion des CBL-Partners gegen Gewebsantigene des F1-Partners könnte durch Reifung bzw. Entstehung spezifischer Suppressor-T-Zellen vermittelt werden. Aufgabe der Suppressorzellen ist es, die Immunantwort immunkompetenter T-Zellen zu unterdrücken. Während Existenz und Bedeutung von Suppressorzellen bei Toleranz gegenüber zahlreichen "thymusabhängigen" Antigenen mit vielen Experimenten belegt wurde (74), besteht über ihre Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der Transplantationstoleranz wenig Klarheit. Aus den Untersuchungen über immunologische Toleranz und Suppressorzellen geht auch hervor, daß dem Thymus bei Entstehung der Suppressorzellen eine zentrale Bedeutung zukommt (74), wahrscheinlich als dem Organ, in dem sich Suppressorzellen entwickeln (165,244).

Der erfolgreiche Versuch Argyris' (6) durch Transplantation H2-kompatibler Thymi auf bestrahlte, thymektomierte und mit Knochenmark rekonstituierte Empfänger eine spezifische immunologische Toleranz bei den Thymusempfängern gegenüber den Gewbsantigenen des Thymusspenders zu induzieren, kann damit erklärt werden, daß sich im allogenen Thymus spe-

zifische Zellen (Suppressor Z.) nach Einwanderung aus dem Knochenmark differenzieren. Thymusspender und -empfänger waren H2-compatibel (Spender C3H, Empfänger CBA). Das gleiche gilt für Transplantationsversuche von Aisenberg (2), der entsprechend vorbehandelte CBA-Empfänger durch Transplantation H2-compatibler Thymi spezifisch tolerant gegenüber den Gewebsantigenen des Thymusspenders machte. Analoge Versuche mit CBL-Mäusen als Empfänger scheiterten vermutlich an der ausgeprägten Immunkompetenz dieser Tiere. Ebenso mißlang eine Toleranzinduktion mit Hilfe der Transplantation H2-incompatibler Thymi, da diese den Empfänger immunisierten und abgestoßen wurden.

In der semiallogenen Parabiose, in der eine Immunisierung des thymektomierten, ALS-behandelten CBL-Partners nicht auftrat, kann der nicht thymektomierte F1-Parabiont die Funktion eines Thymustransplantats ausüben. Die spezifische Toleranz, die im CBL-Partner induziert wird, könnte - betrachtet man die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Rolle, die der Thymus bzw. Suppressor Zellen bei der Induktion und Aufrechterhaltung einer i m m u n o l o g i s c h e n (74,165,244) und möglicherweise einer Transplantationstoleranz hat (2,6) - ebenfalls allein auf einer thymusabhängigen "Hemmung" und nicht auf den (thymusunabhängigen?) Mechanismen, die unter a),b) und c) genannt sind, beruhen. Folgende Gründe sprechen für diese Annahme:

1. Die Reifung lymphoider Parentalzellen nach Thymektomie und ALS-Therapie findet unter semiallogenem Thymuseinfluß und spezifischer Antigenpräsenz statt.

2. Die Verhinderung einer Immunisierung und weitgehende "Ausschaltung zytotoxischer Lymphozyten des CBL-Parabionten durch Thymektomie und ALS reduziert den Bedarf an "blocking factors"; Neu nachreifende Zellen können aktiv gehemmt werden.

3. In teilthymektomierten Parabionten tritt eine spezifische Toleranz nur im thymektomierten Parabiosepartner auf. Die für die Tolernzinduk - tion und -aufrechterhaltung entscheidenden Vorgänge dürften sich demnach im thymektomierten Partner abspielen. Diese Vorgänge können nicht stattfinden, wenn der thymektomierte, ALS-behandelte Partner mit einem ebenfalls thymektomierten, ALS-behandelten Partner parabiosiert wird (s. Exp III und V); eine Toleranz läßt sich mit Hilfe der Parabiose nur dann induzieren, wenn im System ein funktionsfähiger Thymus vorhanden ist. Da zudem bei teilthymektomierten Parabiosen der nicht thymektomierte Parabiont nicht tolerant wird (Exp. VIII) und bei nicht thymektomierten, ALS behandelten Parabiosen keine Toleranz auftritt (Exp. III, V) dürfte die Bedeutung des semiallogenen bzw. allogenen Thymus in einem aktiven und spezifischen Einfluß auf das Immunsystem des t h y m e k t o m i e r t e n Parabionten liegen. Während dabei lediglich i n d i r e k t e

Thymuswirkung und Antigenpräsenz für eine Toleranzinduktion ausreichen müßte auch der nicht thymektomierte Partner tolerant werden. Deshalb besteht der spezifische Einfluß des (semi-) allogenen Thymus in einer d i r e k t e n Wirkung auf lymphoide Zellen des thymektomierten Parabionten im Sinne einer "Hemmung" der immunologischen Reaktionsfähigkeit gegen die Gewebsantigene des Partners.

4. Die wiederholte Injektion einer großen Zahl lymphohämopoietischer F1-Zellen in thymektomierte, ALS-behandelte CBL-(Parental) Tiere führt nicht zu einer spezifischen Toleranz des Zellempfängers gegenüber CBA-Gewebsantigenen (Exp. X), im Gegensatz zur Parabiose analog vorbehandelter Parentalpartner mit unbehandelten F1-Tieren. Wenngleich eine wiederholte Zellinjektion nicht unmittelbar mit einer 21-tägigen Parabiose verglichen werden kann, handelt es sich im Prinzip bei beiden um eine Transplantation semiallogener, hämopoietischer und lymphoider Zellen auf einen maximal immunsupprimierten Empfänger. Im Unterschied zur dreimaligen Zellinjektion erfolgt jedoch die Zellübertragung in der Parabiose durch Kreuzzirkulation über einen Zeitraum von 3 Wochen, wobei auch Parentalzellen in den F1-Partner einwandern können. Wäre (aktive) Transplantationstoleranz allein durch eine intesive Immunsuppression des Empfängers und Antigengabe bzw. Transplantation lymphohämopoietischer Zellen (einschließlich immunkompetenter Lymphozyten) zu induzieren, müßten die Empfängertiere in Experiment X, dessen Protokoll sich eng an Monacos Versuchsplan (142) anlehnt, tolerant werden; denn die Empfänger erhielten nach Thymektomie und ALS zu einem optimalen Zeitpunkt eine Toleranz induzierende Spenderzellzahl (142). Monaco wies indirekt nach, daß Ajax (H2a)-Mäuse nach Thymektomie und ALS-Therapie durch Injektion von (Ajax xC3H/He) F1-Zellen (H2a,2k) zu Chimären wurden, die gegenüber C3H-Gewebe spezifisch tolerant waren. Da in Versuch X trotz entsprechender Behandlung der CBL-Tiere eine Toleranz gegenüber CBA-Haut nicht beobachtet werden konnte, waren diese mit höchster Wahrscheinlichkeit keine oder nur vorübergehende Chimären, obwohl die Zellinoculation zum Zeitpunkt maximaler Immunsuppression erfolgte und damit eine wichtige Voraussetzung für eine "ungestörte" Spenderzellproliferation gegeben war. Wie bereits früher erwähnt, ist es fraglich ob Chimarismus im Zusammenhang mit der Toleranzinduktion und -aufrecherhaltung bei CBL-Parabionten überhaupt eine Rolle spielt. Deshalb ist der"Vorteil" der Parabiose gegenüber der wiederholten Zellinjektion kaum in einem durch permanente Zell transplantation leichter zu erzielenden Chimarismus zu suchen. Er dürfte vielmehr in den beschriebenen besonderen Bedingungen (semiallogener Thymus) für das Immunsystem des thymektomierten, immunsupprimierten Paren-

talpartners liegen, denn auch eine zusätzliche, anhaltende Immunsuppression, wie sie die Parabiose vermitteln könnte (Paralyse immunologischer Restaktivitäten durch Verbrauchsreaktion noch oder wieder kompetenter Zellen des Parentalpartners gegen ein Übermaß an F1-Gewebsantigenen) kann für die Toleranzinduktion nicht entscheidend sein; dann müßte nämlich Toleranz auch in total thymektomierten Parabiosen beobachtet werden. Die Ergebnisse von Monacos Versuch (142) werfen im Zusammenhang mit den vorliegenden Experimenten 2 Fragen auf:

1. Warum führt die Injektion von F1-Zellen in thymektomierte und immusupprimierte Parentalempfänger in der Empfänger-Spender-Kombination Ajax-(Ajax x C3H) F1 zur Toleranz, in der Kombination CBL-(CBL x CBA) F1 jedoch nicht?

Sieht man von einer unterschiedlichen, immunsuppressiven Potenz verschiedener ALS-Pools und von der unterschiedlichen Verweildauer verschiedener Seren im Empfänger ab (94,95), die sicher nur für die erste Zellinjektion von Bedeutung ist, dürfte die Ursache der unterschiedlichen Resultate in der unterschiedlichen Empfänger-Spender-Kombination selbst liegen. Die Kombination CBL-CBA ist eine "starke" Kombination, d.h. CBL- und CBA-Mäuse unterscheiden sich in mehreren wichtigen "Regionen" des H2-Locus, während sich Ajax- und C3H-Mäuse bezüglich ihres Hauptgewebsantigenlocus nur in der H2K-Region unterscheiden?

2. Wie läßt sich die Forderung nach einem Spenderthymus abhängigen, aktiven Mechanismus bei Toleranzinduktion mit den Ergebnissen Monacos vereinbaren?

Die Antwort auf die 2. Frage steht in enger Beziehung zu der ersten: ALS vermittelt nach Thymektomie eine "ausreichende", dauerhafte Immunsuppression in der verträglicheren Ajax-C3h-Kombination, d.h. die Immunkompetenz gegenüber C3H-Gewebsantigene wird völlig ausgeschaltet und kann ohne Thymus nicht wiedererlangt werden. Die beobachtete "spezifische Toleranz" ist in Wirklichkeit eine unspezifische Immuninkompetenz, bei der die "tolerierten", transplantierten F1-Zellen aktiv gegen Drittantigene sind. Man kann hier also nicht von aktiv toleranten Tieren sprechen.

In der unverträglicheren CBL-CBA-Kombination stimulieren dagegen die transplantierten F1-Zellen lymphoide Wirtszellen zur Proliferation, immunologischen Regeneration oder Reifung und Reaktion, die eine Abstoßung des Zelltransplantates zur Folge hat.

5. Toleranz, induziert durch "aktive Suppression", ist auch in Abwesenheit eines Chimarismus (bei Antigenpräsenz = Hauttransplantat) denkbar.

B. Allogene Parabiosen (Exp.VIII).

Die Vorbehandlung der nicht thymektomierten und thymektomierten, allo genen Partner vor Parabiose verhinderte wie in den übrigen Parabiose- kombinationen eine Sensibilisierung durch Partnerantigen. Bei einem Tei der thymektomierten Parabionten ließ sich eine spezifische Transplanta- tionstoleranz gegenüber den Partnergewebsantigenen induzieren, während dagegen alle nicht thymektomierten Parabionten ihre immunologische Kom- petenz innerhalb von 49 (nicht thymektomierte CBA-Partner) und 42 Tagen (nicht thymektomierte CBL-Partner) nach Parabiosetrennung wiedererlang- ten. Ursache der im thymektomierten Partner beobachteten Toleranz könn- ten wie im semiallogenen System klonale Selektion (236), Antikörper ge gen R-Strukturen (172) oder Enhancing bzw blocking antibodies sein. Ei- ne thymusabhängige, zelluläre Hemmung erscheint jedoch auch hier als Er klärung für Induktion und Aufrechterhaltung der Toleranz attraktiver. Selbst wenn andere Mechanismen ebenfalls thymusabhängig sein sollten, würden sie die Frage warum nichtthymektomierte Parabionten trotz Anti- genpräsenz während der Reifungsphase keine Toleranz zeigen, nicht be- friedigend beantworten, denn 50% der thymektomierten CBL-Mäuse und 25% der thymektomierten CBA-Tiere gewinnen nach Parabiose mit dem nicht thymektomierten, allogenen Partner ihre uneingeschränkte Immunkompetenz ebenso rasch wieder wie die nicht thymektomierten Partner. Das bedeutet daß von einer "immunologischen Überlegenheit" auf Seiten des nicht thym ektomierten Partners nicht gesprochen werden kann. Wenn aber die Möglic keit zur immunologischen Regeneration nach ALS-Behandlung im teilthymek tomierten, allogenen Parabiosesystem für beide Partner gleichermaßen be steht, liegt der einzige Unterschied für die Parabionten während der Re generationsphase darin, daß der Thymus für den einen Partner allogen, für den anderen autogen ist. Unter diesen Umständen läßt sich Toleranz kaum auf die Wirkung von Antikörpern zurückführen und kaum einsehen, warum sie jeweils nur im thymektomierten Parabionten auftritt. Sie läßt sich dagegen dann verstehen, wenn man den Unterschied als einen spezifi schen Effekt des allogenen Thymus (und der allogenen Gewebsantigene) au den sich regenerierenden, zellulären Immunapparat des thymektomierten Parabionten berücksichtigt.

Toleranz in diesem Sinne ist unabhängig von einem zellulären Chima- rismus, der wie der Versuch mit syngenen, teilthymektomierten Parabion- ten zeigt (Exp. IX/2) nach ALS-Behandlung und Parabiose nur angedeutet vorhanden ist und im allogenen System eine immunologische "Reaktionslo- sigkeit" des Empfängers gegenüber den Spenderzellen u n d der Spender zellen gegenüber dem Wirt erfordern würde. Treten tatsächlich immunkomp tente Zellen des nicht thymektomierten Partners in den thymektomierten Partner über und proliferieren, so fällt die Chimäre einer Sekundärkran heit zum Opfer (Exp. VIII/2).

Zusammenfassend läßt sich an Hand der Ergebnisse sagen, daß die Behandlung thymektomierter Parabionten mit Antilymphozytenserum dann die Etablierung einer spezifischen Toleranz vermitteln kann, wenn ihr eine 5-wöchige Parabiose mit nicht thymektomierten, semiallogenen und nicht thymektomierten, ALS-behandelten, allogenen Partnern folgt. ALS kann in Verbindung mit Thymektomie und Parabiose das dynamische Gleichgewicht zwischen den die zelluläre Abstoßungsreaktion betreibenden und verhindernden Mechanismen, das die Immunität bestimmt, zu Gunsten einer spezifischen Verhinderung beeinflussen. Die Versuchsergebnisse legen die folgende Interpretation der Vorgänge bei Toleranzinduktion durch Thymektomie, ALS-Therapie und Parabiose nahe:

Die Behandlung der (semi-) allogenen Parabionten vor Parabiose mit ALS unterdrückt die zelluläre Immunität und verhindert eine gegenseitige Sensibilisierung und Immunreaktion. Sie ermöglicht die Ausbildung von Gefäßbrücken und damit durch Kreuzzirkulation den uneingeschränkten Austausch aller im Blut vorhandenen Elemente. In der frühen, thymusabhängigen Phase untersteht das Immunsystem des thymektomierten Parabionten dem indirekten und direkten Einfluß des (semi-) allogenen Partners. Der Thymuseinfluß resultiert entweder in der später zu beobachtenden Wiedergewinnung uneingeschränkter immunologischer Kompetenz oder in einer spezifischen, zellulären Hemmung der Immunreaktion gegen die Antigene des Thymusträgers. Eine Hemmung tritt dann ein, wenn sich bei der Regeneration die spezifisch suppressive Komponente bevorzugt ausprägt. Beide Möglichkeiten, die Ausbildung spezifischer Toleranz oder die Wiedergewinnung der Immunkompetenz ohne Toleranz treten auf und reflektieren die von der Differenz im Hauptgewebsantigenlocus der Partner mitbestimmte Schwierigkeit, immunologische Aggressiv- und Suppressivfaktoren gezielt zu beeinflussen.

ZUSSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von heterologem ALS auf die zelluläre Immunität thymektomierter und nicht thymektomierter Parabionten untersucht. Als Merkmal spezifischer oder unspezifischer Veränderungen im immunologischen Verhalten der so behandelten Tiere diente die Überlebenszeit allogener Hauttransplantate. In den Versuchen fanden Mäuse vom Stamm C57BL und CBA/J Verwendung. Sie unterscheiden sich in ihren Histokompatibilitätsantigenen vor allem durch den H2-Genlocus und stellen damit ein sehr stark gewebsunverträgliches Empfänger-Spendersystem dar.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

1. Die Parabiosierung unbehandelter, allogener Mäuse vom CBL- und CB Stamm führte zu einer hohen Sterberate (9/10) der Parabionten noch während der 21 Tage dauernden Parabiosezeit und zu einer gegenseitigen Sensibilisierung. Eine der Parabiose vorausgehende Thymektomie hatte zwar eine geringere Sterberate (4/10), aber keine sichtbaren immunologischen Veränderungen zur Folge.

2. Die aus umfangreicher Literatur bekannte immunsuppressive Wirkung von ALS konnte bestätigt werden. Die Empfängerbehandlung mit heterologem ALS an 9 aufeinanderfolgenden Tagen vor allogener Hauttransplantation verlängerte sowohl die Überlebenszeit von CBA-Hauttransplantaten bei CBL-Mäusen als auch die von CBL-Haut bei CBA-Empfängern. CBA-Tieren stießen CBL-Haut verzögert zwischen dem 29. und 56. Tag, CBL-Tiere CBA-Hauttransplantate zwischen dem 15. und 28. Tag ab. Eine zusätzliche, deutliche Verzögerung der Abstoßung von Fremdtransplantaten wurde beobachtet, wenn der 9-tägigen ALS-Behandlung die Empfängerthymektomie vorausging: 2 CBA-Mäuse trugen das Transplantat nahezu 100 Tage, 3 länger als 100 Tage und 5 länger als 150 Tage. Die thymektomierten CBL-Empfänger stießen CBA-Haut zwischen dem 29. und 56. Tag ab.

3. Auf das Parabiosesystem angewandt, verhinderte die 9-tägige ALS-Behandlung der allogenen CBL- und CBA-Parabionten vor Parabiose bei gleichzeitiger Ausbildung eines makroskopisch sichtbaren Shunts eine gegenseitige Sensibilisierung und reduzierte die Parabiosesterblichkeit während der 21-tägigen Parabiosezeit deutlich (2/10). Die Überlebenszeit allogener Partnertransplantate, die 1 Woche nach Trennung gesetzt worden waren, war im Vergleich zur Überlebenszeit allogener Transplantate bei nur mit ALS-behandelten Mäusen nicht verlängert. Eine deutliche Verlängerung der Überlebenszeiten von Partnertransplantaten ließ sich beobachten, wenn der 9-tägigen ALS-Behandlung eine Thymektomie beider Parabionten vorausging. Die Transplantatüberlebenszeiten waren jedoch im Vergleich zu denen bei thymektomierten, ALS-behandelten Nicht-Parabionten beider Stämme verkürzt.

4. Mit Hilfe einer modifizierten ALS-Therapie (ALS-Gabe 2 mal an 6 aufeinanderfolgenden Tagen in 2-wöchigem Abstand) konnte eine intensivere Immunsuppression erzielt werden. Nach Thymektomie und dieser ALS-Behandlung wurden bei CBL- und CBA-Mäusen erheblich verlängerte Hauttransplantatüberlebenszeiten beobachtet. Nur 2 CBA-Mäuse stießen ihr Transplantat zwischen dem 100. und 150. Tag ab, 8 trugen auch am 150. Tag intakte Spenderhaut. Die CBL-Mäuse stießen CBA-Haut zwischen dem 36. und 42. (1), 50. und 56. (2), 71. und 77. (3), 85. und 91. (1), 92. und 100. (1), 101. und 150. (2) Tag ab.

5. Die modifizierte ALS-Behandlung führte - allerdings nur nach vorausgegangener Thymektomie - bei einigen Parabionten beider Stämme (5 CBA und 2 CBL) zu einer anhaltenden, unspezifischen Toleranz, wie Partner- und dem Parabiosesystem fremde Hauttransplantate zeigten.

6. In syngenen Parabioseversuchen mit CBL-Mäusen wurde nachgewiesen, daß bei Thymektomie nur eines Partners der Thymus des anderen Partners im gesamten Parabiosesystem wirksam wird.

7. Eine entsprechende Vorbehandlung von CBL-Mäusen (Thymektomie und 2 mal 6 Tage ALS) vor Parabiose mit unbehandelten (CBLxCBA) F1-Mäusen hatte bei einem großen Teil der CBL-Parabionten eine anhaltende, spezifische Toleranz gegenüber CBA-Transplantationsantigenen zur Folge. 12/17 Parentaltieren waren spezifisch tolerant, 4/17 waren nicht tolerant und stießen CBA-Haut zwischen dem 36. und 56. Tag ab. 1 Tier gewann seine immunologische Kompetenz zwischen dem 101. und 150. Tag wieder.

8. Auch das allogene, teilthymektomierte Parabiosesystem, d.h. die Thymektomie nur eines Parabionten vor ALS-Behandlung und Parabiose mit dem nicht thymektomierten, ALS-behandleten Partner führte bei einem Teil der Mäuse zur Entstehung einer spezifischen Toleranz (4/8 CBA, 3/8 CBL). Hier tolerierte der thymektomierte Parabiont die Haut des Partners, während der nicht thymektomierte Parabiont das Partnertransplantat abstieß. 5 CBL-Partner (thymektomiert) gewannen ihre uneingeschränkte, immunologische Kompetenz zwischen dem 36. und 150. Tag zurück. 3 thymektomierte CBA-Tiere stießen die Partnerhaut bis zum 35. Tag ab. 1 CBA-Parabiont war unspezifisch tolerant. Die nicht thymektomierten Partner stießen das Partnertransplantat innerhalb der ersten 42 (CBA) bzw. 35 (CBL) Tage ab.

9. Die Chromosomenanalyse bei teilthymektomierten, syngenen CBA- und CBA/T66-Parabionten, die eine den teilthymektomierten, allogenen Parabionten entsprechende Behandlung erfahren hatten, zeigte, daß in diesem Parabiosesystem nur eine ganz geringe Zelltransplantation stattfindet.

10. Mit Transplantation von 300 x 10^6 CBLxCBA-F1-Milz- und Lymphknotenzellen an Stelle der Parabiose konnte bei thymektomierten, 2 mal mit

ALS-behandelten CBL-Mäusen weder eine unspezifische noch spezifische Toleranz erzielt werden.

Das Verhalten von CBL- und CBA-Mäusen entsprach sich nach gleicher Vorbehandlung in allen Untersuchungen, CBL-Tiere zeigten jedoch im allgemeinen eine stärkere, zelluläre Immunreaktivität, der Anteil an toleranten CBA-Tieren war in allen Fällen höher.

11. Die Ergebnisse wurden einzeln und im Zusammenahng besprochen und die Vorgänge bei Toleranzinduktion im teilthymektomierten, ALS-behandelten Parabiosesystem mit besonderer Berücksichtigung der Thymusrolle diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1 Abbott W.?., Monaco A.P., Russell P.S.: Antilymphocyte serum and cellfree antigen loading, Transplantation Vol. 7 Nr.4, 291-264, 1969

2 Aisenberg A.C.: Allogeneic thymus grafts and the restauration of immune function in irradiated thymectomized mice, J. Exp.Med. 131, 275-286, 1970

3 Allen E.M., Gengozian N.: Effect of antithymocyte globulin pretreatment on immunological reconstitution of lethally irradiated animals, Transplantation Vol. 19 Nr.6, 456-463, 1975

4 Amos D.B., Bach F.H.: Phenotypic expressions of the major histocompatibility locus in man (HL-A): leukocyte antigens and mixed leukocyte culture reactivity, J.Exp. Med. 128, 623-637, 1968

5 Amos D.B., Cohen I.,Klein W.J.: Mechanism of immunologic enhancement, Transplantation Proceedings, Vol. II, Nr.1, 68-75, 1970

6 Argyris B.F.: Thymus-bone marrow interaction in transplantation immunity, Transplantation Vol.8, Nr,4, 538-540, 1969

7 Argyris B.F.: The role of macrophages, thymus- and bone marrow-derived cells in the graft-versus-host reaction, Transplantation Vol. 17, Nr.4, 387-391

8 Atkins R.C., Ford W.L.: Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction, The migration of responding and nonresponding donor lymphocytes, J. Exp. Med. 141, 664-680, 1975

9 Bach J.F., Dardenne M., Goldstein A.L., Guha A., White A.: Appearance of T-cell markers in bone marrow rosette-forming cells after incubation with thymosin, a thymic hormone, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 68, Nr. 11, 2734-2738, 1971

10 Bansal S.C., Hellström K.E., Hellström I., Sjögren H.O.: Cell-mediated immunity and blocking serum activity to tolerated allografts in rats, I. Exp. Med., 137, 590-602, 1973

11 Barnes D.W.H., Louitit J.F.: Protective effects of implants of splenic tissue, Proc. Roy. Soc. Med. 46, Nr. 4, 251-252, 1953

12 Barnes D.W.H., Louitit J.F.; Spleen protection:the cellular hypothesis. In Radiobiology Symposium liège 1954 (Ed. Z.M. Bacq), London, Butterworths, 134-135, 1955

13 Barnes D.W.H., Louitit J.F.: Hemopoietic stem cells in the peripheral blood, The Lancet, Nov. 25, 1967, 1138-1141

14 Batchelor J.R., Silverman M.S.: In Ciba Foundation Sympos. on Transplantation (ed. by Wolstenholme and M.P. Cameron) Little, Brown and Comp., Boston, 1962, 216-231

15 Batchelor J.R., Howard J.G.: Synergic and antargonistic effects of isoantibody upon graft-vs.-host disease, Transplantation 3,2; 161-169, 1965

16 Batchelor J.R., Fabre J., Morris P.J.: Passive enhancement of kidney allografts, Transplantation 13,6; 610-613, 1972

17 Bau J.,,Thierfelder S.: Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation, Transplantation 15,6; 564-567, 1973

18 Becker A.J., McCulloch E.A., Till J.E.: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, Nature (London), 197; 452-454, 1963

19 van Bekkum D.W., de Vries M.J.: in Radiation chimaeras", S. 24, Logos Press Ltd., Acad. Press. Inc. London Ltd. 1967

20 van Bekkum D.W., de Vries M.J.: wie 19, S.84

21 van Bekkum D.W.,de Vries M.J.: wie 19, S. 85-92

22 van Bekkum D.W.,de Vries M.J.: wie 19, S. 93

23 van Bekkum D.W.,de Vries M.J.: wie 19, S. 98-105

24 van Bekkum D.W.,de Vries M.J.: wie 19, S. 105-108

25 " " " : wie 19, S. 128-130

26 van Bekkum D.W.Ledney G.D.,Balner H., van Putten L.M., de Vries M.J.: Suppression of secondary disease following foreign bone marrow grafting with antilymphocyte serum, Ciba Foundation Study Group Nr. 29 Antilympho-cyte Serum S. 97-107, Churchill Ltd. London 1967

27 van Bekkum D.W.; Bone marrow transplantation, Transplantation Proc.,Vol.3 Nr.1, 53-57, 1971

28 van Bekkum D.W., Balner H., Dicke K.A., van den Berg F.G., Prinsen G.H., Hollander C.F.: The effect of pretreatment of allogeneic bone marrow graf recipients with antilymphocytic serum on the acute graft-vs.-host reactio in monkeys, Transplantation, 13,4; 400-407, 1972

29 Bernstein I.D.,Wright P.W.: Immunologic reactivity in tolerant rats, Tran plantation Proc.,Vol.7,1, Suppl. 1(March), 1975; 389-391

30 Billingham R.E., Brent L.,Medawar P.B.: Actively acquired tolerance of fo reign cells, Nature Nr. 4379, Oct. 3,1953; 603-606

31 Billingham R.E.,Defendi V.,Silvers W.K.,Steinmuller D.: Quantitativ studi on the induction of tolerance of skin homografts and on runt disease in neonatal rats, Journal Natt. Cancer Instit. 28, 365-435, 1962

32 Billingham R.E.: In "The Harvey Lectures", series 62, S.21-78, Academic Press, N.Y., 1968

33 Billingham R.E.: The passenger cell concept in transplantation immunology Cell. Imm.,2,1-12; 1971

34 Binhammer R.T.: Studies in rats of the "early disease" of parabiosis into cation, Transplantation 5,4; 580-588, 1967

35 Boak J.L.,Wilson R.E.: Modification of the graft-vs.-host syndrome by ant lymphocyte serum treatment of the donor, Clin.exp.Immunol. 3, 795-800, 1968

36 Brent L.,Brooks C., Lubling N.,Thomas A.V.: Attempts to demonstrate an in vivo role for serum blocking factors in tolerant mice, Transplantation 14 3; 382-387, 1972

37 Buckley R.H.: Reconstitution: Grafting of bone marrow and thymus, in Pro-gress in Immunology (ed. by B. Amos) Academic Press N.Y.& London, 1061-1080, 1971

38 Burnet F.M.: The clonal selection theory of aquired immunity, Cambridge University Press, Cambridge,England, 1959

39 Claman H.N.,Chaperon E.A., Triplett R.F.: Thymus-marrow cell combinations Synergism in antibody production, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1167-1171, 1966

40 Cornelius E.A., Yunis E.J.,Martinez C.: Parabiosis intoxication: Clinical hematologic, and serologic features, Transplantation 5,2; 112-134, 1967

41 Cross A.M., Leuchars E., Miller J.F.A.P.: Studies on the recovery of the immunresponse in irradiated mice thymectomized in adult life, J.Exp.Med. 119, 837-850, 1964

42 Davies A.J.S., Leuchars E., Wallis V., Marchant R., Elliott E.V.: The failure of thymus-derived cells to produce antibody, Transplantation 5,2; 222-231, 1967

43 Davis R.C., Lewis J.I.: The effect of adult thymectomie on the immunosuppression obtained by treatment with antilymphocyte serum, Transplantation 6,8; 879-884, 1968

44 Davies A.J.S.: The thymus and the cellular basis of immunity, Transplant. Rev. Vol. 1, 43-91, 1969

45 Davies A.J.S.: wie 44, S. 48

46 Davies D.A.L., Alkins B.J.: What abrogates heart transplant rejection in immunolo gical enhancement?, Nature 247, S. 294-297, 1974

47 Davies D.A.L.: The mechanism of transplant enhancement, Transplantation Proc. Vol. VII, Nr.1, Suppl. 1; 443-447, 1975

48 Denman A.M., Denman E.J., Holborow E.J.: Immunosuppressive effects of lymphoid cell proliferation in mice receiving anti-lymphocyte globulin, Nature 217, 177-178, 1968

49 Denman A.M., Frenkel E.P.: Mode od action of anti-lymphocyte globulin. I. The distribution of rabbit anti-lymphocyte globulin injected into rats and mice, Immunology 14, 107-112, 1968

50 Doria G.: Homograft reaction in mouse radiation chimaeras. I. Indirect evidence for graft-anti-host activity, J. Immunol. 89, 453-462, 1962

51 Dukor P., Miller J.A.F.P., House W., Allman V.: Regeneration of thymus grafts. I. Histological and cytological aspects, Transplantation 3,5; 639-668, 1965

52 El-Arini M.O., Osoba D.: Differentiation of thymus-derived cells from precursors in mouse bone marrow, The Journal of Exp. Med. 137, 821-837, 1973

53 Elkins W.L.: Pathogenesis of a local graft-vs.-host reaction: Immunogenicity of circulating host Leukocytes, Science, Vol. 159, 1250-1251, 1967

54 Elkins W.L.: Specific and nonspecific lymphoid cell proliferation in the pathogenesis of graft-vs.-host reactions, Transplantation 9,3; 273-301, 1970

55 Elkins W.L.: The sources of immunogenic stimulation of lymphoid cells mediating a local graft-vs.-host reaction in rat kidney, Transplantation 11,6; 551-560, 1971

56 Elkins W.L.: The cellular basis of transplantation tolerance, Transplantation Proc. 5,1; 685-688, 1973

57 Elkins W.L.: Deficit of specific thymus-dependent lymphocytes in transplantation tolerance in the rat, J. Exp. Med. 137, 1097, 1973

58 Eichwald E.J., Lustgraaf E.C., Strainer M.: Genetic factors in parabiosis, J. Nat. Cancer Inst. 23, 1193-1213, 1959

59 Fabre J.W., Morris P.J.: The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats, Transplantation 14,5; 608-616, 1972

60 Fass L., Ochs H.D., Thomas E.D., Mickelson E., Storb R., Fefer A.: Studies of immunological reactivity following syngenic or allogenic marrow grafts in man, Transplantation 16,6; 630-640, 1973

61 Fefer A., Einstein A.D., Thomas E.D., Buckner C.D., Clift R.A., Glucksberg H., Neiman P. E., Storb R.: Bone marrow transplantation for hematologic neoplasia in 16 patients with identical twins, The New England J. of Med. Vol. 290,25; S. 1389-1393, 1974

62 Ford C.E.: The use of chromosom markers in "Tissue Grafting and Radiation" (Ed. H.S. Micklem, J.F. Lou tit), Academic Press, N.Y. & London, S. 197-206, 1966

63 Ford C.E., Hamerton J.L., Barnes D.W.H., Loutit J.F.: Cytological identification of radiation-chimeras, Nature 177, 452-454, 1956

64 Ford C.E., Micklem H.S.: The thymus and lymph-nodes in radiation chimeras. The Lancet, Feb.16. S.359-362, 1963

65 Ford C.E.: Traffic of lymphoid cells in the body, in The Thymus, Ciba Foundation Symposium (Ed. G.E.W. Wolstenholme, Porter) Little, Brown and Co. Boston, 151-152, 1966

66 Ford W.L., Simmonds S.J., Atkins R.C.: Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction, II. Autoradiographic estimates of the frequency of donor lymphocytes which respond to each Ag-B-determined antigenic complex, J.Exp.Med. 141, 681-696, 1975

67 Fox M.: Cytological estimation of proportion of proliferating donor cells during graft-vs.-host disease in F1 hybrid mice infected with parental spleen cells, Nature 195, 1024-1025, 1962

68 French M.E.,Batchelor J.R.,Watts H.G.: The capacity of lymphocytes from rats bearing enhanced kidney allografts to mount graft-vs.-host reactions. Transplantation 12,1; 45-48, 1971

69 French M.E., Batchelor J.R.: Enhancement of renal allografts in rats and man, Transplant. Rev. 13, 115-141, 1972

70 Gallagher M.T., Richie E.R., Heim L.R., Judd K.P., Trentin J.J.: Inhibition of the graft-vs.-host reaction, I. Reduction of the graft-vs.-host potential of mouse spleen cells (with sparing of stem cells) by treatment with antilymphocyte globulin-derived Fab fragments, Transplantation 14,5; 597-602, 1972

71 Gengozian N., Congdon C.C.,Allen E.A.,Toya R.E.: Immune status of allogeneic radiation chimeras, Transplantation Proc. 3,1; 434-436, 1971

72 Gengozian N., Edwards C.L.,Vodopick H.A.,Hübner K.F.:Bone marrow transplantation in a leukemic patient following immunsuppression with antithymocyte globulin and total body irradiation, Transplantation 15,5; 446-454, 1973

73 Gershon R.K., Kondo K.: Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes, Immunology 18,723-737, 1970

74 Gershon R.K.: T cell control of antibody production, in Contemporary Topics in Immunobiology,3,1; (ed. M.D. Cooper, N.L. Warner) Plenum Press, N.Y.& London, 1-40, 1975

75 Goodman J.W.,Hodgson G.S.: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice, Blood 19,6; 702-714, 1962

76 Gowans J.L.: The fate of parental strain small lymphocytes in F1 hybrid rats, Ann. N.Y. Acad. of Sci. 99, 432-455, 1962

77 Gozzo J.J., Wood M.L., Pompei R.,Monaco A.P.: In vitro modification of donor bone marrow used to produce enhanced graft survival in antilymphocyte serum (ALS)-treated mice, Transpl.Proc. V,1; 853-856, 1973

78 Graw R.G., Leventhal B.G., Yankee R.A., Rogentine G.N.,Whang-Peng J., Ginnif M.H., Herzig G.P., Halterman R.H., Henderson E.S.: HL-A and mixed leukocyte culture matched allogeneic bone marrow transplantation in patients with acute leukemia, Transpl. Proc. III,1; 405-408, 1971

79 Gray J.G., Monaco A.P., Wood M.L., Russell P.S.: Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice,I. In vitro and in vivo properties, J. of Immunology, 96,2; 217-228, 1966

80 Hallenbeck G.A., Kubista T.P., Shorter R.G.: Restoration of immunologic competence of neonatally thymectomized mice by isogeneic and xenogeneic thymic grafts, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 1142-1146, 1969

81 Harrison G.A., Owen J.J.T., Ritter M.A.: Interaction of mouse spleen cells in diffusion chambers, Nature 219, 302-303, 1968

82 Hasek M., Karakoz I.,Skamene E.,Chutna J., Nouza K., Bubenik J.,Nemec M., Sovova V.: Protective action of homolgous serum component on graft rejection, Transpl. Proc. I,1; 527-529, 1969

83 Hellström I.,Hellström K.E.: Neonatally induced allograft tolerance may be mediated by serum-borne factors, Nature 230, 49-50, 1971

84 Heron I., Meyer H.: Cell-mediated immune response in rats during acute allograft rejection and in rats developing allograft acceptance due to passive enhancement, Tissue Antigens 3, 348-351, 1973

85 Heron I.: Is transplantation tolerance in the rat serum-mediated?, Transplantation 15,6; 534-539, 1973

86 Howard J.G., Michie D.: Tests on the tolerance inducing power of lethally irradiated spleen cells, Transplantation Bulletin 27,2; 455-457, 1961

87 Howard J.C.: The life-span and recirculation of marrow-derived small lymphocytes from the rat thorcic duct, J. Exp. Med. 135, 185-199, 1972

88 Howard J.C., Hunt S.V., Gowans: Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats, J.Exp. Med. 135, 200-219, 1972

89 Jakobson L.O., Marks E.K., Robson M.J., Gaston E., Zirkle R.E.: The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation, J. Lab. Clin. Med. 34, 1538-1543, 1949

90 Jakobson L.O., Marks E.K., Gaston E.O., Robson M., Zirkle R.E.: The role of the spleen in radiation injury, Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 70, 740-742, 1949

91 Jakobson L.O., Simmons E.L., Bethard W.F., Marks E.K., Robson M.J.: The influence of the spleen on hematopoietic recovery after irradiation injury, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 455-459, 1950

92 Jeejeebhoy H.F.: Immunological studies on the rat thymectomized in adult life, Immunology,9, 417-425, 1965

93 Jeejeebhoy H.F.: The effect of heterologous anti-lymphocyte serum on lymphocytes of thymus and marrow origin, J.Exp. Med. 132, 963-975, 1970

94 Jeejeebhoy H.F., Singla O.: Mode of recovery from the effects of heterologous anti-lymphocyte serum, I. Recovery of the immune response, Immunology 22, 789-799, 1972

95 Jeejeebhoy H.F., Singla O.: Mode of recovery from the effects of heterologous anti-lymphcyte serum, II. Recovery of the cells involved in antibody production, Immunology 22, 801-812, 1972

96 José D.G., Stutman O., Good R.A.: Inhibition of graft-vs.-host reactions in mice by host-directed antibody, Transplantation 17,2; 211-215, 1974

97 Jurin M., Allegretti N.: Parabiosis of parental strain and F1 hybrid mice, Proc. of the Yogoslaw. Immunological Soci. Vol. I,1; 39-40, 1969

98 Kaliss N.: Immunological enhancement of tumor homografts in mice, A review, Cancer Research 18, 992-1003, 1958

99 Kaliss N.: The elements of immunologic enhancement: A consideration of mechanisms, Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 64-79, 1972

100 Katz D.H., Benacerraf B.: Regulatory influence of activated T cells,in Advances in Immunology 15, 30/31, 1972

101 Lance E.M. : The mechanism of action of anti-lymphocyte serum, J. Exp. Med 130, 49-69, 1969

102 Lance E.M., Taub R.N.: Segregation of lymphocyte populations through differential migration, Nature Vol. 221, 841-843, 1969

103 Ledney G.D.: Influence of antilymphocyte serum on hemopoietic proliferatio in the mouse as measured by spleen weight and colony-forming unit assays, Exp. Hematol. 14, 42-43, 1967

104 Ledney G.D., van Bekkum D.W.: Suppression of acute secondary disease in th mouse with antilymphocyte serum, Advance in Transplantation, (ed. J. Dausset, J. Hamburger, G. Mathè, Williams & Wilkins, Baltimore), S. 441-447, 1968

105 Ledney G.D., van Bekkum D.W.: Secondary disease in irradiated mice grafted with allogeneic bone marrow from antilymphocyte serum-treated donors, J. Nat. Cancer Inst. 42, 633-641, 1969

106 Ledney G.D.: Cellularity and colony-forming units of hematopoietic tissue of mice after antilymphocytic serum treatment, Transplantation 13,6; 558-569, 1972

107 Leuchars E., Wallis V.J., Davies A.J.S.: Mode of action for anti-lymphocyte serum, Nature 219, 1325-1328, 1968

108 Levey R.H., Medawar P.B.: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum, Proc. Nat. Acad. Sci. London, 56, 1130-1137, 1966

109 Levey R.H., Medawar P.B.: Some experiments on the action of antilymphoid antisera, Ann. N.Y. Acad. Sci. 129,1; 164-177, 1966

110 Lindsley D.L., Odell T.T., Tausche F.G.: Implantation of functional erythropoietic elements following total-body irradiation, Proc, Soc. Exp. Biol. Med. 90, 512-515, 1955

111 Lorenz E., Uphoff D., Reid T.R., Shelton E.: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections, J. Nat. Cancer Inst. 12, 197-201, 1951

112 Lorenz E., Congdon C.C.: Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone, J. Nat. Cancer Inst. 14, 955-961, 1954

113 Lorenz E., Congdon C.C., Uphoff D.: Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections, Radiology 58, 863-877, 1952

114 Louitit J.F., Micklem H.S.: "Secondary disease" among lethally irradiated mice restored with haematopoietic tissues from normal or iso-immunized foreign mice, British J. Exp. Pathol. 43, 77-87, 1962

115 Marquet R.L., van Bekkum D.W.: The reactivity of blood lymphocytes from actively enhanced rats, Transpl. Proc. Vol.V,1; 631-634, 1973

116 Martin W.J., Miller J.A.F.P.: Cell to cell interaction in the immune response, IV. Site of action of antilymphocyte globulin, J.Exp.Med. 128, 855-874, 1968

117 Martin W.J.: Assay for the immunosuppressive capacity of antilymphocyte serum, J. Immunology, 103,5; 979-989, 1969

118 Mathè G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Cattan A., Schneider M.: Adoptive immunotherapy of acute leukemia: Experimental and clinical results, Cancer Research 25, 1525-1531, 1965

119 Mathè G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Choay J., Trolard P., Schneider M., Hayat M., Schlumberger J.R., Jasmin Cl.: Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphcytic serum, Brit. Med. J.2, 131-136, 1970

120 Mathè G., Schwarzenberg L., Amiel J.L.: Bone marrow, in Transplantation (ed. Najarian J.S., Simmons R.L.) Philadelphia, Lea & Febinger, S. 588 , 1972

121 McBride R.A., Nisbet N.W., Skowron-Cendrzak A.: Rate of cross-circulation in parabiosis: Its significance, relationship to genetic disparity, and experimental modification, Transplantation 5,4; 569-579, 1967

122 Mckenzie I.F.C., Snell G.D.: Comparative immunogenicity and enhanceability of individual H-2k and H-2D specificities of the murine histocompatibility-2 complex, J. Exp. Med. 138, 259-274, 1973

123 Medawar P.B.: The use of antigenic tissue extracts to weaken the immunological reaction against skin homografts in mice, Transplantation 1,1; 21-38, 1963

124 DeMeester T.R., Anderson N.D., Shaffer C.F.: The effect of heterologous anti lymphocyte serum on mouse hemopoietic stem cells, J. Exp. Med. 127, 731-748, 1968

125 Merritt C.B., Darrow C.C., Vaal L., Rogentine G.N.: Bone marrow transplantation in rhesus monkeys following irradiation, Transplantation 14,1; 9-20, 1972

126 Metcalf D.: The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse, Brit. J. Haemat, 6, 324-333, 1960

127 Metchnikoff E. :
Ann. Inst. Past. 13, 737-769, 1899

128 Meuwissen H.J.: Bone marrow transplantation in immunosuppressed or congenitally immune deficient patients, Transpl. Proc. V,3; 1291-1297, 1973

129 Miller J.F.A.P.: Immunological function of the thymus, The Lancet, Sept. 30, 1961, S.748-749

130 Miller J.F.A.P.,Doak S.M.A., Cross A.M.: Role of the thymus in recovery of the immune mechanism in the irradiated adult mouse, Proc. Soc. Biol. Exp. Med. 112, 785-792, 1963

131 Miller J.F.A.P.: Effect of thymektomy in adult mice on immunological responsiveness, Nature 208, 1337-1338 , 1965

132 Miller J.F.A.P.: The thymus in relation to the development of immunological capacity, in The Thymus, Ciba Foundation Symposium (ed. G.E.W. Wolstenholme and R.Porter), Little, Brown and Co. Boston, 1966 S.153-174

133 Miller J.F.A.P., Mitchell G.F., Weiss N.S.: Cellular Basis of the immunological defects in thymectomized mice, Nature 214, 992-997 , 1967

134 Miller J.F.A.P., Mitchell G.F.: Influence of the thymus on antigenreactive cells and their precursors, in Advance in transplantation (ed. J.Dausset, J.Hamburger & G. Mathè), Munksgaard, Copenhagen, S. 79-85, 1968

135 Miller J.F.A.P., Mitchell G.F.: Cell to cell interaction in the immune response, I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes, J.Exp. Med. 128, 801-820, 1968

136 Miller J.F.A.P., Mitchell G.F.: Thymus and antigen-reactive cells, Transplant. Rev. I, 3-43, 1969, (S. 10,11,12)

137 Mitchell G.F., Miller J.F.A.P.: Immunological activity of thymus and thoracic duct lymphocytes, Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 296-303, 1968

138 Mitchell G.F., Miller J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response, II, The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes, J.Exp. Med. 128, 821-837, 1968

139 Möller G.: Studies on the mechanism of immunological enhancement of tumor homografts, I. Specificity of immunological enhancement, J. Nat. Cancer Inst. 30, 1153-1175, 1963

140 Monaco A.P., Wood M.L., Russell P.S.: Adult thymectomy: Effect on recovery from immunologic depression in mice, Science 149, 432-435, 1965

141 Monaco A.P., Wood M.L., Gray J.G., Russell P.S.: Studies on heterlologous anti-lymphocyte serum in mice, II. Effect on the immune response, J.Immunology 96,2; 229-238, 1966

142 Monaco A.P., Wood M.L., Russell P.S.: Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice, III. Immunologic tolerance and chimerism produced across the H-2 locus with adult thymectomy and anti-lymphocyte serum, Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 190-209, 1966

143 Monaco A.P., Franco D.J.: The effect of heterologous antilymphocyte serum on the formation of H-2 antibody and the induction of allograft immunity, Transplant. Proc. I,1; 474-478, 1969

144 Monaco A.P.,Wood M.L., van der Werf B.A., Russell P.S.: Effects of antilymphocyte serum in mice, dogs and man, Ciba Foundation Study group Nr. 29 Antilymphocyte Serum, S.111-134, Churchill Ltd. London 1967

145 Müller-Ruchholtz W., Müller-Hermelink H.K., Sonntag H.G.: Specific inactivation of lymphoid cells in bone marrow grafts, Transplant. Proc. V,1; 877-880, 1973

146 Myburgh J.A.: Repeated parabiosis in mice: Immunological and haematological sequelae and demonstration of a hybrid-anti-parent reaction, Transplantation 6,3; 400-410, 1968

147 Nacić B., Silobrčić V.: Tolerance of skin homografts related to fatal disease in seperated rat parabionts, Nature 182, 264-265, 1958

148 Nacić B., Teplitz R.L., Ohno S.: Cytological analysis of parabiotic disease in mice, Transplantation 4,1; 22-31, 1966

149 Nacić B.,Mikuška J., Kaštelan A., Springer O., Silobrčić V.: Quantitative analysis of the chimeric state in mice, IV. Cytological examination of mice rendered tolerant by neonatal inoculation of F1 hybrid spleen cells, Immunology 18,1; 119-129, 1970

150 Nehlsen S.L.: Prolonged administration of antithymocyte serum in mice, I. Observations on cellular and humoral immunity, Clin. Exp. Immunol. 9; 63-7 1971

151 Nisbet N.W.: Immunological tolerance in the absence of cellular chimerism, Nature 214, 94-95, 1967

152 Nisbet N.W.: Induction of specific immunological tolerance by parabiosis and antilymphocyte serum, Transplantation 8,4; 356-368, 1969

153 Nisbet N.W.: Some aspects of immunological tolerance investigated by parent to F1 hybrid parabiosis in mice, Transplantation 11,3; 318-324, 1971

154 Nossal G.J.V., Cunningham A., Mitchell G.F., Miller J.F.A.P.: Cell to cell interaction in the immune response, III. Chromosomonal marker analysis of single antibody-forming cells in reconstituted, irradiated, or thymectomized mice, J.Exp. Med. 128, 839-850, 1968

155 Nowell P.C., Hirsch B.E., Fox D.H., Wilson D.B.: Evidence for the existence of multipotential lympho-hematopoietic stem cells in the adult rat, J. Cell Phys. 75, 151-158, 1970

156 Ochs H.D., Storb R., Graham T.C., Rudolph R.H., Kolb H.J.,Shiurba R.A., Thomas E.D.: Immune status of long-term canine irradiation chimeras (abstract) Blood 38, 787, 1971

157 Order S.E., Waksman B.H. : Cellular differentiation in the thymus, Transplatation 8,6; 785-800, 1969

158 Order S.E., Rawlins C.: Marrow-derived thymus precursor cells, Radiology 99, 177-183, 1971

159 Osoba D., Miller J.F.A.P.: Evidence for a humoral thymus factor responsible for the maturation of immunological faculty, Nature 199, 653-654, 1963

160 Owen R.D.: Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins, Science 1o2, 400-401, 1945

161 Owens A.H., Santos G.W.: The induction of graft-vs.-host disease in mice treated with cyclophosphamide, J. Exp. Med. 128, 277-290, 1968

162 Owens A.H., Santos G.W.: The effect of cytotoxic drugs on graft-vs.-host disease in mice, Transplantation 11,4; 378-382, 1971

163 Parrott D.M.V., De Sousa M.A.B., East J.: Thymus-dependend areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice, J. Exp. Med. 123, 191-203 1966

164 Parrott D.M.V., De Sousa M.: Thymus-dependent and thymus-independent populations: origin, migratory patterns and lifespan, Clin. Exp. Immunol. 8, 663-684, 1971

165 Phillips-Quagliata J.M., Bensinger D.O., Quagliata F.: The role of the thymu during the induction of tolerance of a thymus-dependent antigen, J. Immunol 111,6; 1712-1721, 1973

166 Porter K.A.: Immune haemolysis in rabbit radiation-chimaeras, Brit. J. Exp. Path. 41, 72-80, 1960

167 Raff M.C.: Theta isoantigen as a marker of thymus-derived lymphocytes in mice, Nature 224, 378-379, 1969

168 Raff M.C., Wortis H.H.: Thymus dependence of theta-bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice, Immunology 18, 931-942, 1970

169 Raff M.C.: Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence, Immunology 19, 637-650, 1970

170 Raff M.C., Owen J.J.T.: Thymus-derived lymphocytes: Their distribution and role in the development of peripheral lymphoid tissues of the mouse, Eur. J. Immunol. 1, 1971

171 Raff M.C.: Theta-bearing lymphocytes in nude mice, Nature 246, 350-351, 1973

172 Ramseier H., Lindemann J.: Aliotypic antibodies, Transplant. Rev. 10, 57-96 1972

173 Ramseier H.: Immunization against abolition of transplantation tolerance, Eur. J. Immunol. 3, 156-164, 1973

174 Ramseier H.: Spontaneous release of T cell receptors for alloantigens, II. Induction of antbodies to T cell receptors, Eur. J. Immunol. 5, 25-26, 1975

175 Richie E.R., Gallagher M.T., Trentin J.J.: Prevention of graft-vs.-host disease by Fab fragments derived from ALG, Transplant. Proc. V,1; 873-876, 1973

176 Rodriguez-Paradisi E., Thierfelder S., Götze D., Eulitz M., Beil E.: Cytology and histology of haemopoietic cell transplantation under the influence of antilymphocyte serum (ALS) in mice, I. The in vivo effect of antilymphocytic globulin on haemopoietic tissue, Clin. Exp. Immunol. 8, 107-119, 1971

177 Rodt H., Thierfelder S., Eulitz M.: Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation, III. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acut secondary disease in mice, Eur. J. Immunol. 4, 25-29, 1974

178 Rogentine G.N., Rosenberg S., Merritt C.B., Yankee R.A., Leventhal B.G., Graw R.G., Greipp P., Whang-Peng J., Fahey J.L.: Successful allogeneic bon marrow transplantation in aplastic anemia, (abstract) Blood 36, 829, 1970

179 Rogentine G.N. et al.(wie 178): Antilymphocyte globulin as the sole immuno suppressant for bone marrow transplantation in aplastic anemia, Transplan- tation 15, 5; 514-517, 1973

180 Roitt I.M., Torrigiani G., Graeves M.F., Brostoff J., Playfair J.H.L.: The cellular basis of immunological responses, The Lancet, Aug 16 1969, S.367- 371

181 Rolstad B., Ford W.L.: Immune responses of rats deficient in thymus-derive lymphocytes to strong transplantation antigens (Ag-B), Transplantation 17, 4; 405-415, 1974

182 Rolstad B., Williams A.F., Ford W.L.: The alloantibody response to a stron transplantation antigen (Ag-B), Transplantation 17,4; 416-423, 1974

183 Rouse B.T., Warner N.L.: Induction of T cell tolerance in agammaglobuline- mic chickens, Eur. J. Immunol. 2, 102-104, 1972

184 Rowley D.A., Fitch F.W., Stuart F.P., Köhler H., Cosenza H.: Spezific sup- pression of immune responses, Science 181, 1133-1141, 1973

185 Russell P.S., Monaco A.P.: Heterologous antilymphocyte sera and some of their effects, Transplantation 5,4; 1086-1099, 1967

186 Safford J.W., Tokuda S.: Suppression of the graft-vs.-host reaction by pas sive immunization of donor against recipient antigens, Proc. Soc. Exp. Bio Med. 133, 651-654 , 1970

187 Santos G.W., Owens A.H.: Syngeneic and allogeneic marrow transplants in tH cyclophosphamide pretreated rats,in Advances in Transplantation (ed. J.Dau set, J.Hamburger, G.Mathe) Munksgaard, Copenhagen S. 431-436, 1968

188 Santos G.W., Owens A.H.: Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice, Transplant. Proc. I,1; 44-46, 1969

189 Santos G.W., Sensenbrenner L.L., Burke P.J., Colvin M., Owens A.H., Bias W.B. Slavin R.E.: Marrow transplantation in man following cyclophosphamide Transplant. Proc. III,1; 400-404, 1971

190 Santos G.W., Sensenbrenner L.L., Burke P.J., Mullins G.M., Bias W.B., Tutschka P.J., Slavin R.E.: The use of cyclophosphamide for clinical marro transplantation , Transplant. Proc. IV,4; 559-564, 1972

191 Santos G.W.: Immunosuppression for clinical marrow transplantation, Semi- nars in Hematology Vol. 11,3; 341-351, 1974

192 Sauerbruch F., Heyde M.: Parabiose künstlich vereinigter Warmblüter , Münc ner Med. Wochenschrift, 55. Jahrgang, 155-156, 1908

193 Simonsen M.: Graft versus host reactions. Their natural history, and appli cability as tools of research, Progr. Allergy Vol. 6, 349-467 , 1962

194 Simonsen M.: The factor of immunization : Clonal selection theory investi- gated by spleen assays of graft-versus-host reaction, in Ciba Foundation Symposium on Transplantation (ed. Wolstenholme, Cameron), Little, Brown an Co. Boston 1962 S. 185- 209

195 Skowron-Cendrzak A.: Facilitation of homograft tolerance in parabiotic mi by treatment with amethopterin, Transplantation 2,4; 487495, 1964

196 Slavin R.E., Santos G.W.: The graft versus host reaction in man after bone marrow transplantation: Pathology, Pathogenesis, Clinical features, and Im plication, Clinical Immunology and Immunopathology 1, 472-498, 1973

197 Small M., Trainin N.: Cotribution of a thymic humoral factor to the development of an immunologically competent population from cells of mouse bone marrow, J.Exp.Med. 134,3 ;786-800, 1971

198 Speck B., Dooren L.J., De Koning J., van Bekkum D.W., Eernisse J.G., Elkerbout F., Vossen J.M., van Rood J.J.: Clinical experience with bone marrow transplantation: Failure and success, Transplant. Proc. III,1; 409-413, 1971

199 Sprent J., von Boehmer H., Nabholz M.: Association of immunity and tolerance to host H-2 determinants in irradiated F1 hybrid mice reconstituted with bone marrow cells from one parental strain, J. Exp. Med. 142, 321-331,1975

200 Staines N.A., Guy K., Davies D.A.L.: Passice enhancement of mouse skin allo grafts, Transplantation 18,2; 192-195, 1974

201 Storb R., Epstein R.B., Rudolph R.H., Thomas E.D.: The effect of prior transfusion on marrow grafts between histocompatible canine siblings, J. Immunology 105,3; 627-632, 1970

202 Storb R., Graham T.C., Shiurba R., Thomas E.D.: Treatment of canine graft-vs.-host disease with methotrexate and cyclophosphamide following bone marrow transplantation from histoincompatible donors, Transplantation 10,2; 165-172, 1970

203 Storb R., Epstein R.B., Graham T.C., Thomas E.D.: Methotraxate regimens for control of graft-vs.-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts, Transplantation 9,3; 240-246, 1970

204 Storb R., Rudolph R.H., Kolb H.J., Graham T.C., Mickelson E., Erickson V., Lerner K.G., Kolb H., Thomas E.D.: Marrow grafts between DL-A-matched canine littermates, Transplantation 15,1; 92-100, 1973

205 Storb R., Kolb H.J., Graham T.C., Kolb H., Weiden P.L., Thomas E.D.: Treatment of established graft-vs.-host disease in dogs by antithymocyte serum or prednisone, Blood 42,4; 601-609, 1973

206 Storb R., Gluckman E., Thomas E.D., Buckner C.D., Clift R.A., Fefer A., Glucksberg H., Graham T.C., Johnson F.L., Lerner K.G., Neiman P.E., Ochs H. Treatment of established human graft-vs.-host disease by antithymocyte globulin, Blood 44,1; 57-75, 1974

207 Storb R., Thomas E.D., Buckner C.D., Clift R.A., Johnson F.L., Fefer A., Glucksberg H., Giblett E.R., Lerner K.G., Neiman P.: Allogeneic marrow graf ting for treatment of aplastic anemia, Blood 43,2; 157-180, 1974

208 Stutman O., Yunis E.J., Good R.A.: Carcinoge-induced tumors of the thymus, IV. Humoral influences of normal thymus and functional thymomas and influence of postthymectomy period on restoration, J. Exp. Med. 130,4; 809-819, 1969

209 Stutman O, Yunis E.J., Good R.A.: Studies on thymus function, I. Cooperative effect of thymic function and lymphohemopoietic cells in restoration of neonatally thymectomized mice, J. Exp. Med. 132; 585-600, 1970

210 Sutman O., Yunis E.J., Good R.A.: Studies on thymus function, II. Cooperative effect of newborn and embryonic hemopoietic liver cells with thymus function, J. Exp.Med. 132; 601-612, 1970

211 Taub R.N., Lance E.M.: Effects of heterologous anti-lymphocyte serum on the distribution of Cr-labelled lymph node cells in mice, Immunology 15, 633-642, 1968

212 Taub R.N., Lance E.M.: Histopathological effects in mice of heterologous antilymphocyte serum, J. Exp. Med. 128; 1281-1296, 1968

213 Templeton J.W.m Thomas E.D.; Evidence for a major histocompatibility locus in the dog, Transplantation 11,4; 429-431, 1971

214 Thierfelder S., Baumann P, Bail E., Mempel W.:
XIII. Int. Congress Hematol. Abstract Vol. S. , München 1970

215 Thomas E.D., Ashley Ch.A., Lochte H.L.,Jaretzki A., Sahler O.D., Ferrebee J.W.: Homografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation, Blood 14, 720-736, 1959

216 Thomas E.D., Buckner C.D., Rudolph R.H., Fefer A., Storb R., Neiman P.E., Bryant J. I., Chard R.L., Clift R.A.,Epstein R.B., Fialkow P.J., Funk D.D., Giblett E.R., Lerner K.G., Reynolds F.A., Slichter S.: Allogeneic marrow grafting for hematologic malignancy using HL-A matched donor-recipient sibling pairs, Blood 38,3; 267-287, 1971

217 Thomas E.D., Buckner C.D., Storb R., Neiman P.E., Fefer A., Clift R.A., Slichter S.J., Funk D. D., Bryant J.I., Lerner K.G.: Aplastic anemia treated by marrow transplantation, Lancet 1,284-289, 1972

218 Thomas E.D., Buckner C.D., Clift R.A., Fass L., Fefer A., Lerner K.G., Neiman P., Rowley N., Storb R.: Marrow grafting in patients with acute leukemia, Transplant. Proc. V,1; 917-922, 1973

219 Trainin N., Small M.: Conferment of immunocompetence on lymphoid cells by thymic humoral factor, in Ciba Foundation Group Nr. 30 ~~Antilymphocyte Seru~~ 24-37, Churchill Ltd. London 1967

220 Trentin J.J., Judd K.P.: Prevention of acute graft-vs.-host mortality with spleen-absorbed antithymocyte globulin, Transplant. Proc. V,1; 865-868, 1973

221 Turk J.L., Willoughby D.A.: Central and peripheral effects of antilymphocyte sera, The Lancet, Feb. 4, 1967, 249-251

222 Tutschka P.J., Santos G.W.: Marrow transplantation in the aplastic rat, I., Effect of cyclophosphamide and rabit anti-rat thymocyte serum as immunosuppression, Transplantation 20,2; 101- , 1975

223 Tyler R.W., Everett N.B.: A radioautographic study of hemopoietic repopulation using irradiated parabiotic rats, Relation to the stem cell problem, Blood 28,6; 873-890, 1966

224 Tyler R.W., Everett N.B., Schwarz M.R.: Effect of antilymphocytic serum on rat lymphocytes, J. Immunology 102,1; 179-186, 1969

225 Voisin G.A., Kinsky R.: Protection against runting by specific treatment of newborn mice, followed by increased tolerance, in Ciba Foundation Symposium on Transplantation (ed. Wolstenholme, Cameron) Little, Brown & Company, Boston 1962, 286-326

226 Voisin G.A., Kinsky R., Maillard J.: Protection against homologous disease in hybrid mice by passive and active immunological enhancement-facilitation, Transplantation 6,2; 187-202, 1968

227 Voisin G.A., Kinsky R., Duc H.T.: Immune status of mice tolerant of living cells, II. Continous presence and nature of facilitation-enhancing antibodies in tolerant animals, J.Exp. Med. 135, 1185-1203, 1972

228 Voisin G.A.: Immune rejection, facilitation, and transplantation tolerance, Transplant. Proc. VII,1; Suppl 1, 361-366, 1975

229 Vos O, Buurman W.A., Ploemacher R.E.: Mobilization of haemopoietic stem cells (CFU) into the peripheral blood of the mouse; effects of endotoxin and other compounds, Cell Tissue Kinet. 5, 467-479, 1972

230 Waksman B.H., Arbouys S., Arnason B.G.: The use of specific "lymphocyte" antisera to inhibit hypersensitive reactions of the "delayed" type, J. Exp. Med. 114, 997-1021, 1961

231 Wallis V.J., Leuchars E., Chwalinski S., Davies A.J.S.: On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimaeras, Transplantation 19, 2-11, 1975

232 Weigle W.O.: Immunological unresponsiveness, in Advances in Immunology (ed. F.J. Dixon & H.G. Kunkel) Vol. 16, Acad. Press, N.Y. & London, 61-122, 197

233 Weissman I.L.: Thymus cell migration, J. Exp. Med. 126, 291-304, 1967

234 Werner J.: Die Wirkung von ALS und Thymektomie auf die chronische Sekundärkrankheit bei Mäusen, Inaugural-Dissertation, München 1972

235 White A., Goldstein A.L.: Thymosin, a thymic hormone influencing lymphoid cell immunological competence, in Ciba Foundation Group 36, Hormones and the immune response, 3-19, 1970

236 Wilson D.B., Billingham R.E.: Lymphocytes and transplantation immunity, in Advances in Immunology 7, 189-273, 1967

237 Wilson R.E., Maggs P.R., Vanwijck R., Shaipanich Th., Holl-Allen R.T.J., Lukl P., Simonian S.J.: Active enhancement of renal allografts in dag and rat by subcellular antigen, Transplant. Proc. III,1; 705-707, 1971

238 Wood M.L., Monaco A. P., Gozzo J.J., Liegeois A.: Use of homozygous allogeneic bone marrow for induction of tolerance with antilymphocyte serum: Dose and timing, Transplant. Proc. III,1; 676-679, 1971

239 Woodruff M.F.A., Anderson N.A.: Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of anti-lymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats, Nature 200, 702, 1963

240 Woodruff M.F.A., James K., Anderson N.F., Reid B.L.: In vivo and in vitro properties of antilymphocytic serum, in Ciba Foundation Study group Nr.29, Antilymphocyte Serum S.57-68, Churchill Lfd. London 1967

241 Wortis H.H.: Immunological responses of "nude" mice, Clin. Exp. Immunol. 8, 305-317, 1971

242 Wright P.W., Bernstein I.B., Hamilton B., Gluckman J.C., Hellström K.E.: Cell-mediated reactivity and serum blocking activity in tolerant rats, Tran plantation 18,1; 46-55, 1974

243 Wu A.M., Till J.E., Siminovitch L., McCulloch E.A.: Cytological evidence fo a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system, J. Exp. Med. 127, 455-463, 1968

244 Zan-Bar I., Nachtigal D., Feldman M.: Specific suppressor T cells operative in immune tolerance, Transplant. Proc. VII,1, Suppl. 1; 341-343, 1975

245 Zimmerman C.E.: Active enhancement of renal allografts, Transplant. Proc. III,1; 701-703, 1971

ANHANG

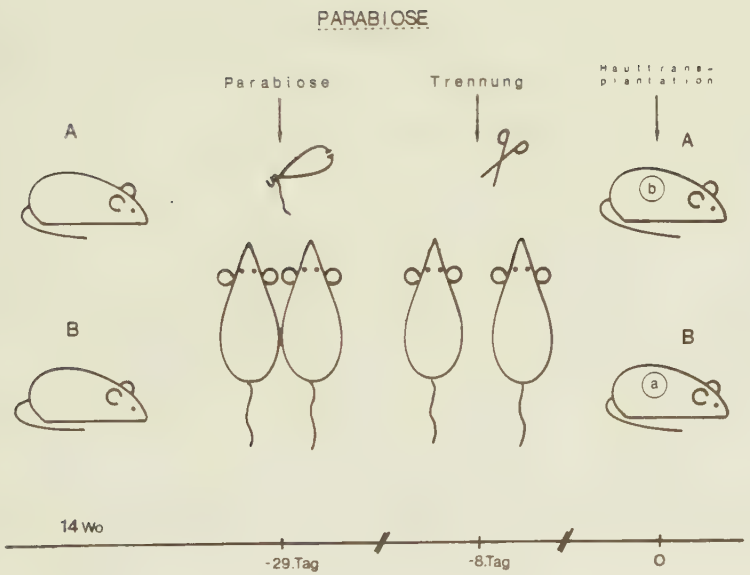


Abb. 1 Parabiose zwischen unbehandelten CBL- u. CBA-Mäusen

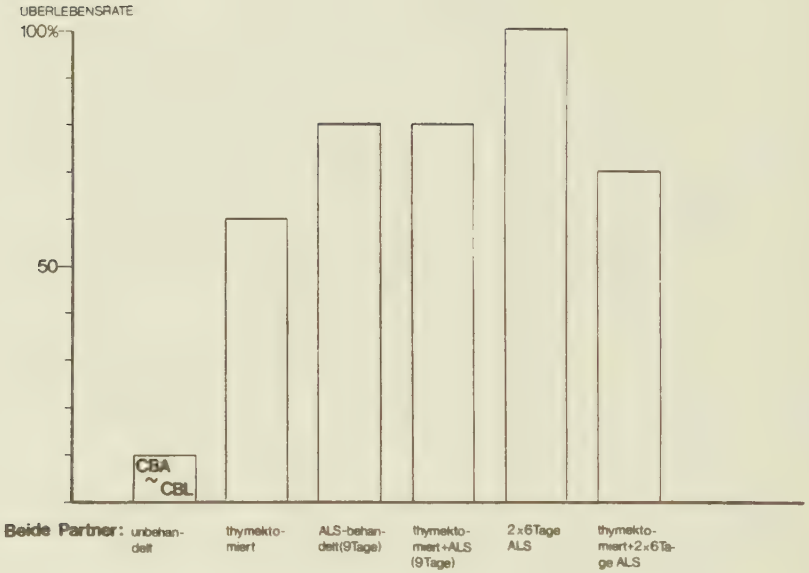


Abb. 2 Überlebensrate verschieden vorbehandelter Parabiosen 21 Tage nach Parabiosebeginn (am Trennungstag)
(Jede Gruppe besteht aus 10 Parabiosepaaren)

Abb. 3 Parabioseüberlebensrate

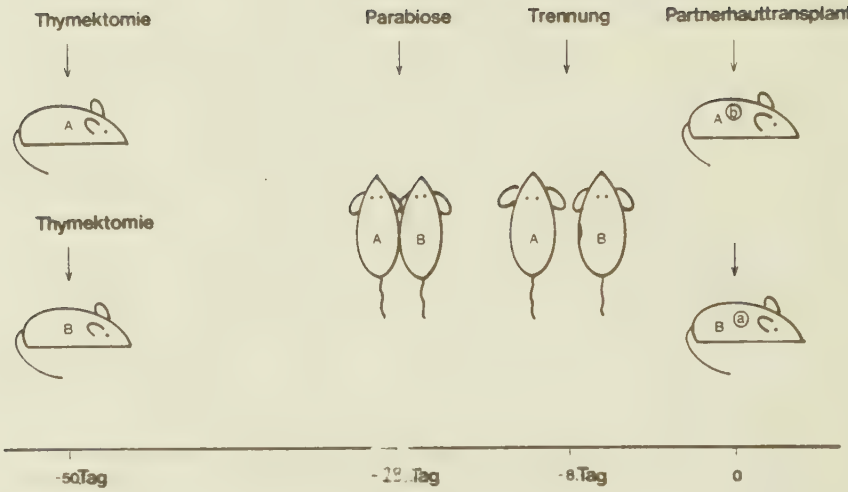


Abb. 4 Anordnung für den in Abschnitt I/2 beschriebenen Versuch

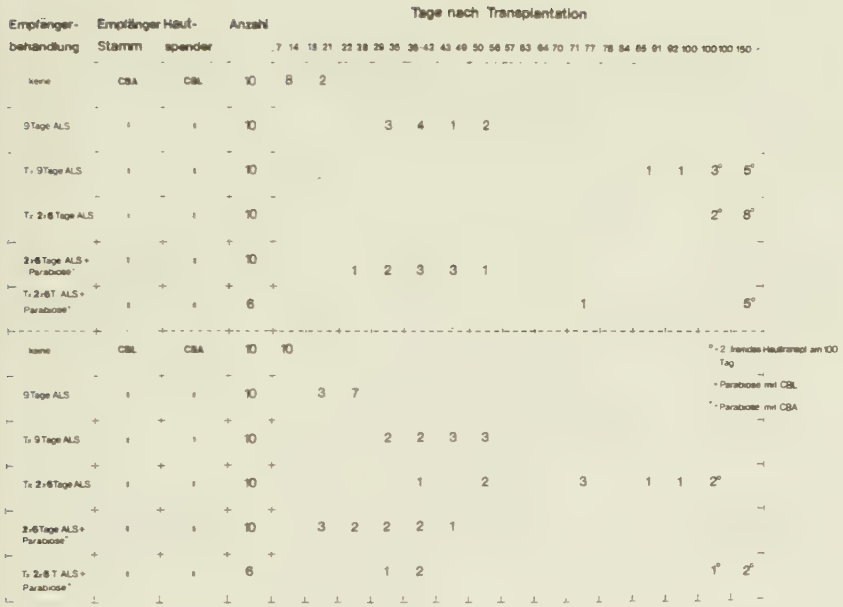


Abb. 5 Vergleichende Zusammenstellung von Hauttransplantatüberlebenszeiten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL- u. CBA-Empfängertieren.

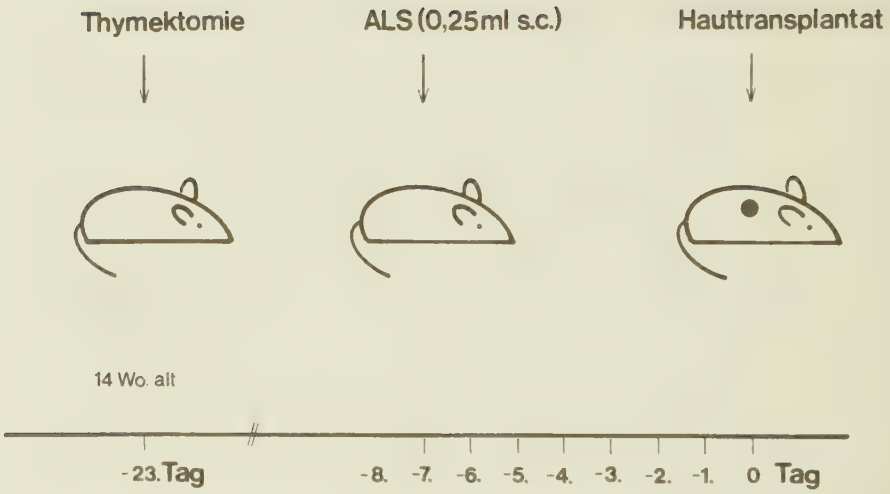


Abb. 6 Anordnung für den in Abschn. II/2 beschriebenen Versuch

Empfänger	Behandlung	Haut-spender	Anzahl	Überlebenszeit der Transplantate in Tagen																		
				7-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-56	57-63	64-70	71-77	78-84	85-91	92-100	100-150	151>
CBA	ALS (9 Tage)	CBL	10				3	4	1	2								
CBA	Thymex+ALS	CBL	10												1	1	3	5
CBA	ALS+Para-biose	CBL	8		1	5	2											
CBA	Thymex+ALS+ Parabiose	CBL	8				1	3	2	2								
CBL	ALS(9 Tage)	CBA	10		3	7												
CBL	Thymex+ALS	CBA	10				2	2	3	3								
CBL	ALS+Para-biose	CBA	8	1	6	1												
CBL	Thymex+ALS+ Parabiose	CBA	8			6	2											

Abb. 7 Hauttransplantatüberlebenszeiten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL- u. CBA-Empfängertieren.

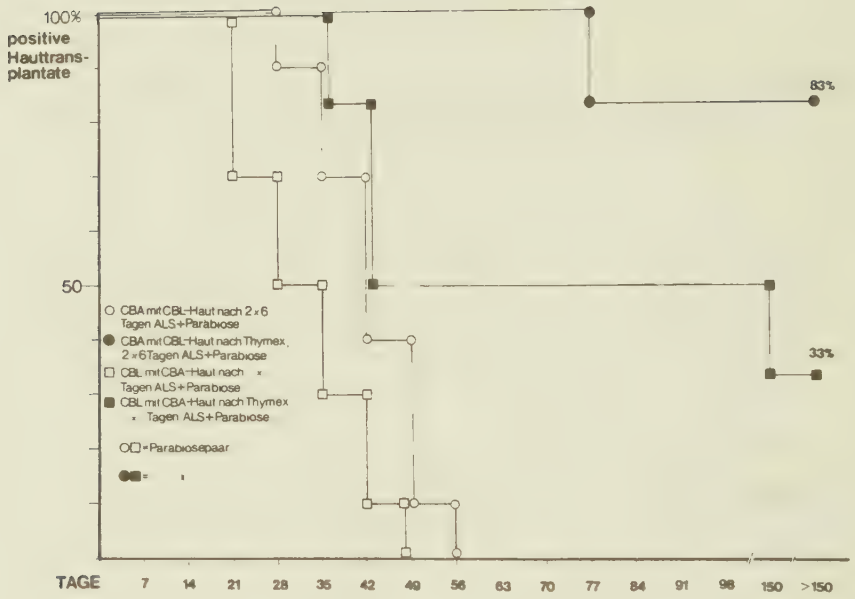


Abb. 8 Überlebenszeiten von Partnerhauttransplantaten bei thymektomierten und nicht thymektomierten, 2 x 6 Tage ALS behandelten Parabionten.

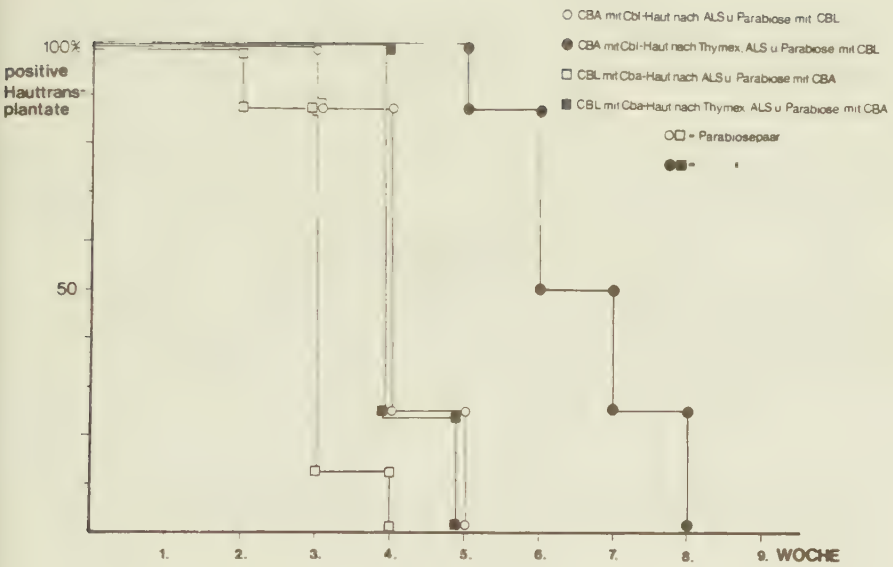


Abb. 9 Hauttransplantatüberlebenszeiten (Partnerhaut) bei thymektomierten u. nicht thymektomierten, ALS (9 Tage) behandelten Parabionten.

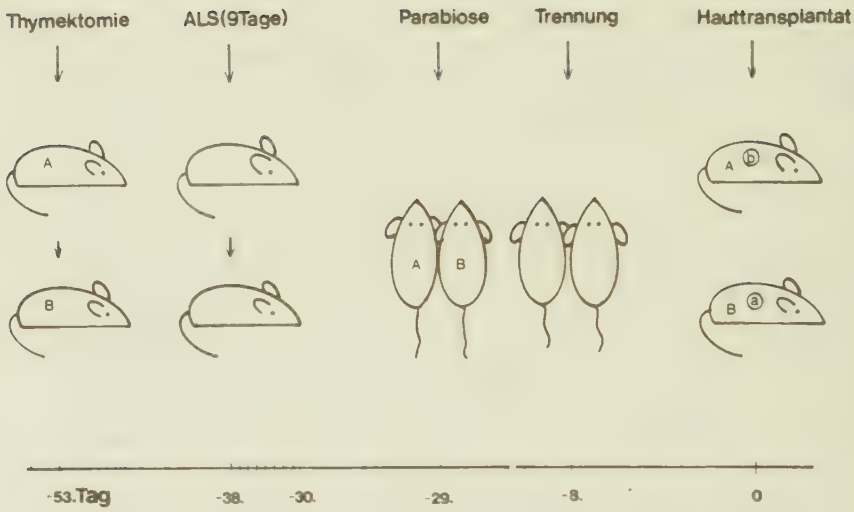


Abb. 10 Anordnung des in Abschn. III/2 beschriebenen Versuchs

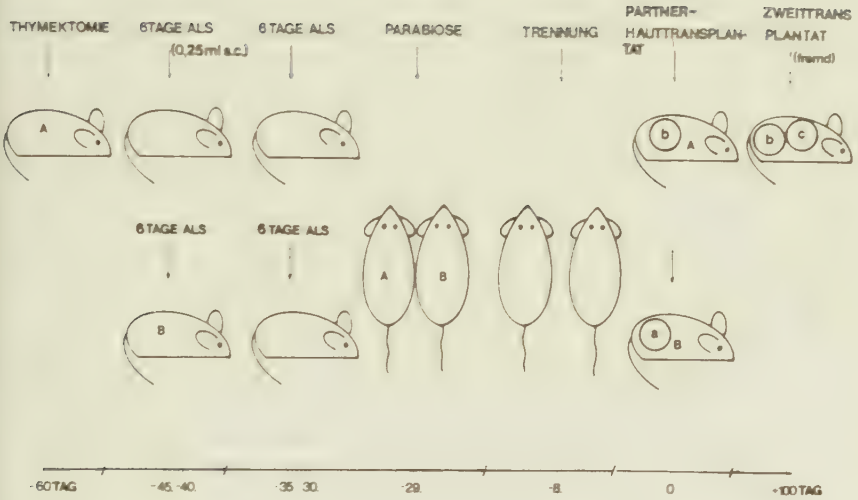


Abb. 11 Anordnung des in Abschn. V/1,2 beschriebenen Versuches

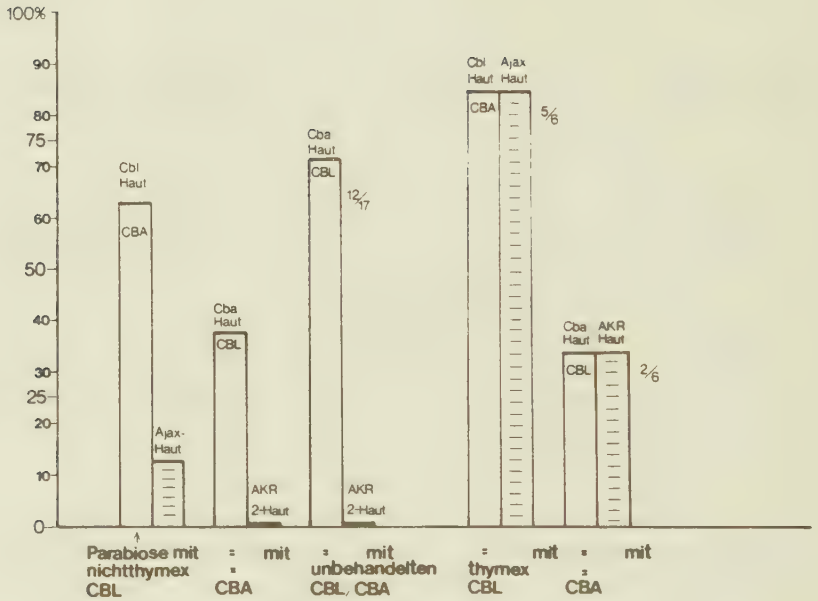


Abb. 12 Prozent positiver Ersttransplantate (CBL-Haut auf CBA u. CBA-Haut auf CBL) und Zweittransplantate (Ajax-Haut auf CBA, AKR-Haut auf CBL) am 150. Tag nach erst- bzw. 50. Tag nach Zweittransplantation bei unterschiedlich vorbehandelten Parabionten.

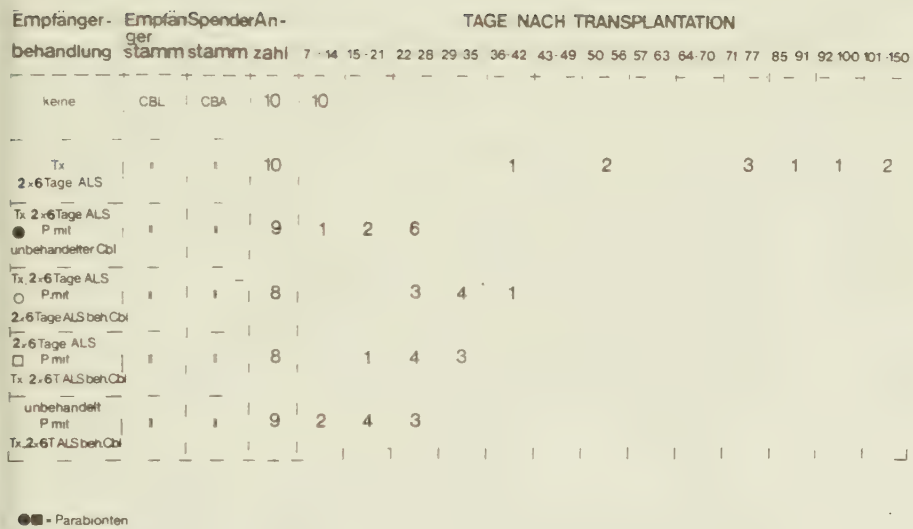


Abb. 13 Vergleich zwischen den Hauttransplantatüberlebenszeiten unterschiedlich vorbehandelter, syngener Parabionten.

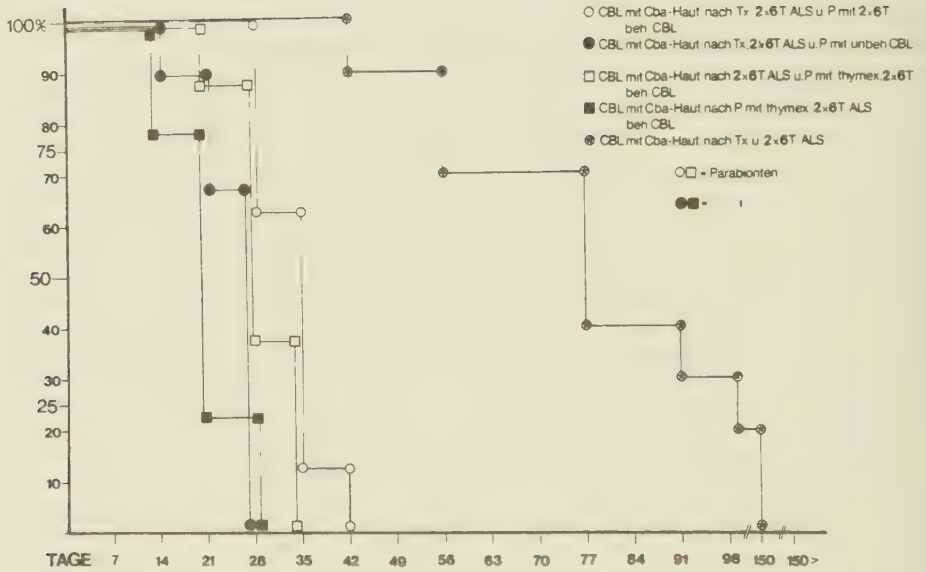


Abb. 14 Überlebenszeiten allogener CBA-Hauttransplantate bei unterschiedlich vorbehandelten, syngenen CBL-Parabionten. Dazu Überlebenszeit von CBA-Haut bei thymekt., ALS behandelten CBL-Mäusen (2 x 6 Tage)

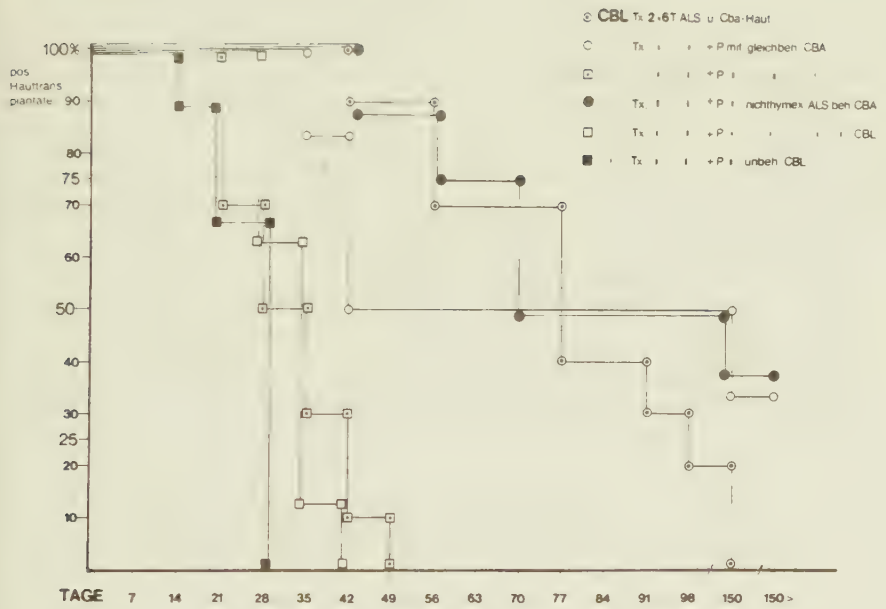


Abb. 15 Überlebenszeiten von CBA-Hauttransplantaten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL- Empfängertieren.

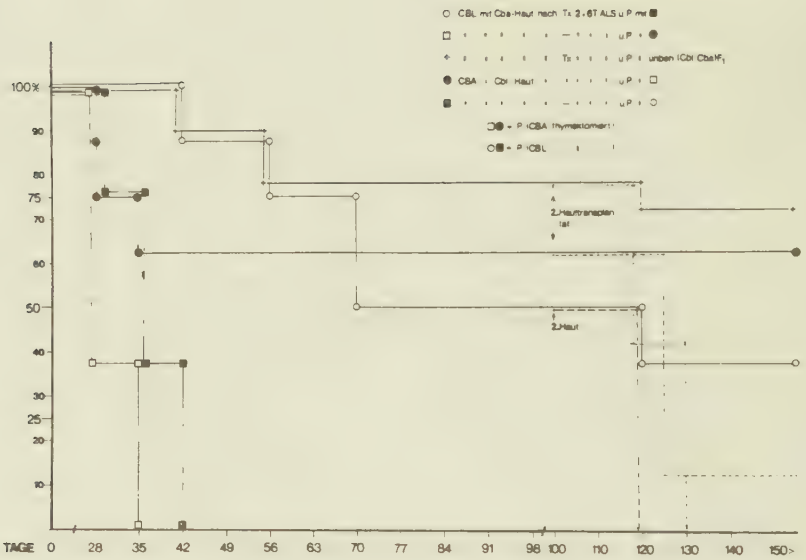


Abb. 16 Hauttransplantatüberlebenszeiten allogener Partnertransplantate bei unterschiedlich vorbehandelten Parabionten (Teilthymektomie), sowie Überlebenszeiten allogener Zweittransplantate.

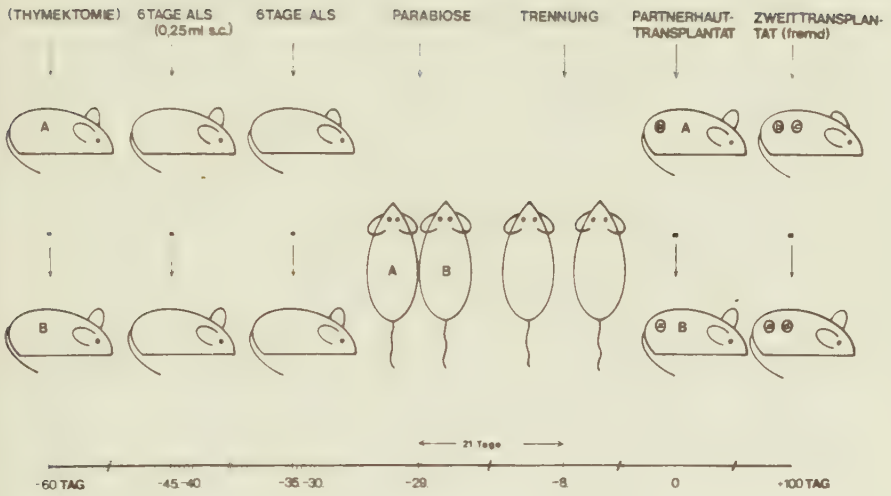


Abb. 17 Anordnung der in Abschn. VIII/1,2 beschriebenen Versuche

Empfängerbehandlung	Parabiose mit	Empfänger-stamm	Hautspender-stamm	Anzahl	Tage nach Transplantation 7-14	15-21	22-28	29-35	36-42	43-49	50-56	57-63	64-70	71-77	78-84	85-91	92-100	101-150	151-∞
keine	—	CBA	CBL	10	8	2													
Tx 9 Tage ALS	—	CBA	CBL	10														3*	5*
Tx 9 Tage ALS	Tx 9 Tage ALS beh CBL	CBA	CBL	8				1	3	2	2								
Tx 2x6 Tage ALS	—	CBA	CBL	10														2*	6*
2x6 Tage ALS	2x6 Tage ALS beh CBL	CBA	CBL	10			1	2	3	3	1								
Tx 2x6 Tage ALS	Tx 2x6 Tage ALS beh CBL	CBA	CBL	8									1						5*
Tx 2x6 Tage ALS	2x6 Tage ALS beh CBL	CBA	CBL	8			1*	1											5*
keine	—	CBL	CBA	10	10														
Tx 9 Tage ALS	—	CBL	CBA	10				2	2	3	3								
Tx 9 Tage ALS	Tx 9 Tage ALS beh CBA	CBL	CBA	8			6	2											
Tx 2x6 Tage ALS	—	CBL	CBA	10					1		2			3		1	1	2*	
2x6 Tage ALS	2x6 Tage ALS beh CBA	CBL	CBA	10		3	2	2	2	1									
Tx 2x6 Tage ALS	Tx 2x6 Tage ALS beh CBA	CBL	CBA	6				1	2									1*	3*
Tx 2x6 Tage ALS	2x6 Tage ALS beh CBA	CBL	CBA	8					1		1		2					1*	3*
Tx 2x6 Tage ALS	unbehandelter CBL CBA	CBL	CBA	17					2		2							1*	12*
Tx 2x6 Tage ALS	2x6 Tage ALS beh CBL	CBL	CBA	8				3	4	1									
Tx 2x6 Tage ALS	unbehandelter CBL	CBL	CBA	9	1	2	6												

Abb. 18 Zusammenfassender Vergleich von Hauttransplantatüberlebenszeiten bei CBL- u. CBA- Tieren nach unterschiedlicher Vorbehandlung

• = diese Tiere erhielten am 100. Tag ein allogenes Zweittransplantat

+ = Tiere verstarben

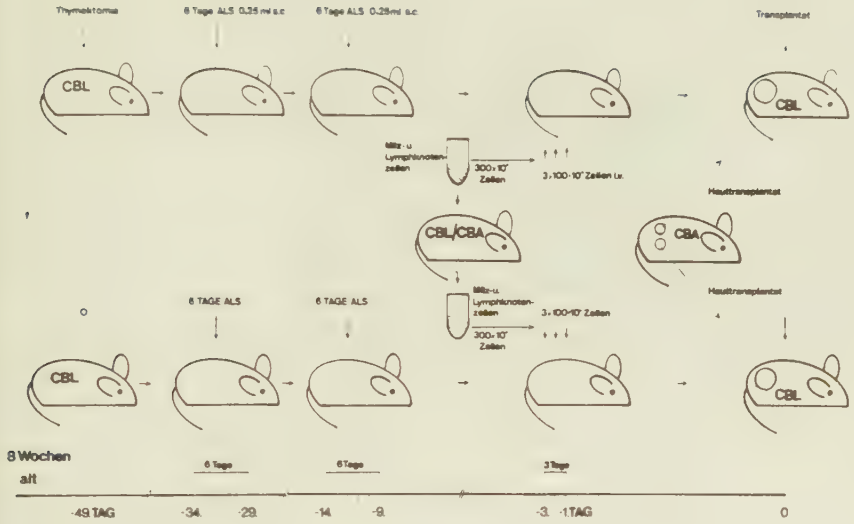
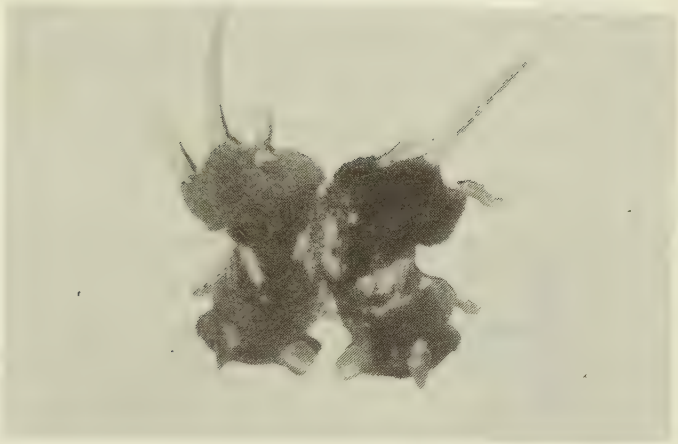


Abb. 19 Anordnung des in Abschn. X beschriebenen Versuches

Abb. 20 Vergleich der CBA'Hauttransplantatüberlebenszeiten bei unterschiedlich vorbehandelten CBL–Parabionten u. CBL–Mäusen, die 300 x 10^6 Milz– u. Lymphknotenzellen erhalten hatten.



CBA-Maus (oben), CBL-Maus (unten) unmittelbar nach Parabiosierung.

Parabiosepaar nach 3 Wochen Parabiose unmittelbar vor Trennung.

Chromosomenanalyse (Exp. IX)

I. CBA thymektomiert, CBA-T6T6 nichtthymektomiert

		Paar I			Paar II			Paar III		
		Tag 1	Tag10	Tag21	Tag 1	Tag10	Tag21	Tag 1	Tag10	Tag21
Milz	% T6T6 in CBA	1	3	6	2	5	7	4	8	10
	% CBA in T6T6	3	1	4	2	3	2	2	2	1
Lymph-knoten	% T6T6 in CBA	2	4	5	4	2	8	4	5	11
	% CBA in T6T6	3	2	0	2	0	1	3	1	5
Knochen-mark	% T6T6 in CBA	1	1	2	0	0	2	1	2	2
	% CBA in T6T6	0	0	1	0	1	1	0	0	1
Thymus	% T6T6 in CBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	% CBA in T6T6	0	0	0	0	1	2	1	3	5

II. Beide Partner thymektomiert

	Paar I			Paar II			Paar III		
	Tag 1	Tag10	Tag21	Tag 1	Tag10	Tag21	Tag 1	Tag10	Tag21
% T6T6 in CBA	3	8	5	2	5	3	3	3	1
% CBA in T6T6	1	4	0	2	2	5	2	1	4
% T6T6 in CBA	3	0	6	2	4	3	4	2	2
% CBA in T6T6	2	0	5	1	1	2	3	3	3
% T6T6 in CBA	0	1	0	0	0	1	0	1	1
% CBA in T6T6	0	2	1	0	0	2	0	0	0

LEBENSLAUF

3.3.1947	geboren als zweiter Sohn des Arztehepaares Karl und Gerda Schwerdtfeger
1953-1957	Grundschule in München und Ansbach
1957-1966	Humanistisches Gymnasium in Ansbach und Kaufbeuren
1966	Abitur in Kaufbeuren.
1966-1972	Studium der Humanmedizin in Göttingen und München.
19.12.1972	Staatsexamen an der Universität München
1973	Medizinalassisten am Kreiskrankenhaus Füssen (Chirurgie) und an der I. Med. Univ. Klinik München (Innere Medizin).
1974	Approbation als Arzt
1971-1974	Doktorarbeit in der Abteilung für Immunologie im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung Neuherberg.
1974-1975	Postdoctoral fellow an Johns Hopkins Medical School in Baltimore, Maryland,U.S.A.
1976	Wissenschaftlicher Assistent an der Freien Universität Berlin, Hämatologie, Onkologie, Klinikum Westend.